

MARCELA PERDIZA

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE APARELHOS
ORTODÔNTICOS REMOVÍVEIS, COM OU SEM UTILIZAÇÃO DE
AGENTE ANTIMICROBIANO, PELA TÉCNICA *CHECKERBOARD DNA-
DNA HYBRIDIZATION* – ESTUDO CLÍNICO
RANDOMIZADO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Grau de Mestre em Odontopediatria.

Orientador: PROF. DR. PAULO NELSON-FILHO

Ribeirão Preto

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Perdiza, Marcela

Avaliação da contaminação microbiana de aparelhos ortodônticos removíveis, com e sem utilização de agente antimicrobiano, pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* - Estudo Clínico Randomizado, 2009.

83p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Programa: Odontopediatria.

Orientador: Nelson-Filho, Paulo

1. *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.
2. Clorexidina.
3. Aparelhos ortodônticos removíveis.
4. Desinfecção.
5. Biologia Molecular.

MARCELA PERDIZA

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE APARELHOS
ORTODÔNTICOS REMOVÍVEIS, COM OU SEM UTILIZAÇÃO DE
AGENTE ANTIMICROBIANO, PELA TÉCNICA *CHECKERBOARD DNA-
DNA HYBRIDIZATION* – ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Grau de
Mestre em Odontopediatria.

Data da defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha mãe **Maria Cristina Alves Pereira,**

Pelo seu amor e sua dedicação e por ter, em todos os momentos desta longa caminhada, me incentivado e me dado coragem para prosseguir.

Ao meu marido **Marcus Luciano Belfort de Andrade Sandin,**

Pelo seu amor e compreensão nesses anos em que estive na estrada entre Ribeirão Preto e São Paulo. Por sua paciência, carinho e por suas palavras de incentivo a minha jornada profissional. A você, minha gratidão e o meu amor.

À minha Irmã **Carla Perdiza,**

Pelo seu amor, carinho, dedicação, amizade e palavras de incentivo.

*"Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível, e, de repente, você estará fazendo o impossível".*

(São Francisco de Assis)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**

Por sua inteligência, honestidade e vocação de professor e pesquisador. Por seu exemplo de seriedade, dedicação e amor à pesquisa e seu incondicional apoio nos momentos mais difíceis.

Por todos os ensinamentos transmitidos e experiências compartilhadas.

Por me ensinar a ser melhor e mais capaz a cada dia, pela imensa contribuição na minha formação pessoal e profissional e por acreditar em mim, depositando toda sua confiança e respeito nesta jornada em busca do conhecimento. Enfim, agradeço por tudo que aprendi durante nossa convivência nestes dois anos do curso e expresso aqui minha eterna gratidão e admiração.

“Não são as palavras, mas é o silêncio que revela a grande admiração”

(Aulo Gélío)

A Deus,

Por sempre me guiar pelo caminho correto, por mais difícil que ele seja.

Por sempre estar presente ao meu lado, me amparando e me dando forças para continuar e pela vitória agora conquistada.

“O Senhor é o meu pastor; nada me faltará.

Deitar-me faz em pastos verdejantes; guia-me mansamente a águas tranqüilas.

Refrigera a minha alma; guia-me nas veredas da justiça por amor do seu nome.

Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.

Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos; unges com óleo a minha cabeça, o meu cálice transborda.

Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida, e habitarei na casa do Senhor por longos dias” (Salmo 23, Velho Testamento).

À **Profª. Dra. Maria Conceição Pereira Saraiva**, por seu valioso auxílio e orientação na análise estatística dos resultados, não medindo esforços para me auxiliar. Seus ensinamentos foram mais do que acadêmicos. Muito obrigada.

A toda minha família, em especial aos meus avós, **Joaquim e Elvira**, à minha tia **Silvia Alves Pereira** e a meu **Tio Antonio Augusto Alves Pereira**, pelo exemplo de união familiar e amor transmitido, em todos os momentos da minha vida.

A meu querido cunhado **José Mario Chiariello**, por me ajudar e me incentivar em todos os momentos que precisei, dando-me apoio emocional e sempre me fazendo sorrir.

A meu padrasto **Waldo Adalberto da Silveira Júnior**, pela acolhida em sua casa, apoio e carinho.

A minha nova família **Sandin**, pelo apoio constante, pelo amor e carinho dedicado a mim, incentivando-me na busca incessante pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Diretor **Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon** e Vice-Diretor **Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros**.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora **Prof. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva** e do vice-coordenador **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, por terem me concedido a oportunidade de participar deste conceituado programa de Pós-Graduação, por terem acreditado no meu potencial e pela recepção e cordialidade a mim dispensada, contribuindo imensamente para enriquecer minha carreira profissional. Meus sinceros agradecimentos.

Às **Profas. Dras. Magda Gomes Feres** e **Luciane Cristina de Figueredo**, do Laboratório de Pesquisa em Odontologia II, Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular da Universidade de Guarulhos, e especialmente à Bióloga **Izilvânia Barreto**, pela contribuição no processamento do DNA e análise das amostras, pela sua atenção, disponibilidade e dedicação.

Ao Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, em especial à **Profá. Dra. Izabel Yoko Ito** e à técnica **Maraisa Palhão Verri**, pela assistência, gentileza e por terem colocado o laboratório de Microbiologia à nossa disposição.

Às queridas amigas e pós-graduandas **Cristina Bueno Brandão**, **Vanessa Bernardini Maldonado** e **Olívia Santos de Oliveira Verardo**, pelo constante apoio e incentivo e pela verdadeira amizade demonstrada em todos os momentos em que convivemos.

A amiga e pós-graduanda **Marcela Cristina Damião Andrucoli**, pela colaboração na realização da parte experimental deste trabalho, pela cumplicidade, disposição, força de vontade, sabedoria e, acima de tudo, amizade e carinho.

Aos funcionários da Clínica Infantil **Vera Ribeiro do Nascimento**, **José Aparecido Neves do Nascimento** e **Cleber Barbosa Rita**, pelo empenho em ajudar, simpatia e atenção, que foram fundamentais para a que a parte clínica deste trabalho fosse realizada.

Ao funcionário **Carmo Eurípedes Terra Barreto**, por me orientar e me auxiliar na confecção dos aparelhos. Pela simpatia e boa vontade em dividir comigo, por horas semanais, seu local de trabalho.

Aos funcionários do setor de esterilização, **Benedito Aparecido da Silva** e **José Galvão da Silva** pelo carinho, disponibilidade e atenção, sempre dispostos a me ajudar.

Aos amigos e colegas de Pós-Graduação **Vanessa Bernardini Maldonado**, **Olívia Santos de Oliveira Verardo**, **Cristina Bueno Brandão**, **Taiana de Melo Dias**, **Giselle de Ângelo Souza Leite**, **Rosângela Moraes Marques Sawan**, **Marta Maria Martins Giamatei Contente**, **Lourdes Y. G. Olmedo**, **Remberto Marcelo Argandoña Valdez**, **Ana Paula Ramos Bernardes da Silva**, **Edécio Garcia Júnior** e **Rodrigo Machado da Silva**, pelos bons momentos juntos, pela ajuda e carinho demonstrado em todos os momentos que convivemos. Pelas risadas, aprendizado e dificuldades que compartilhamos. Meu profundo agradecimento a todos vocês.

À **Profª. Dra. Sada Assed**, **Profª. Dra. Aldevina Campos de Freitas**, **Profª. Dra. Maria Cristina Borsatto**, **Profª. Dra. Alexandra Mussolino Queiroz**, **Profª. Dra. Kranya Victória Díaz Serrano**, **Profª. Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva** e **Dra. Gisele Faria**, da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, pela orientação constante e experiências compartilhadas.

Aos docentes da Disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, Prof^{as}. Dra. Míriam Aiko Nakane Matsumoto, Prof. Dr. Adílson Thomazinho, Prof^{as}. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuaní, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira e Prof^{as}. Dra. Carla Enoki Itikawa, pelos ensinamentos, colaboração e agradável convivência.

Aos funcionários Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Filomena Lelli Placciti e Marco Antonio dos Santos, do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da FORP/USP, pela confiança, disponibilidade e amizade.

À Isabel Cristina Galino Sola e Regiane Cristina Moi Sacilotto, da seção de Pós-Graduação da FORP/USP, pela atenção que sempre me dispensaram.

À Colgate/Palmolive, pelas escovas e Periogard[®] gentilmente cedidos.

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo auxílio financeiro, indispensável para o desenvolvimento deste projeto.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

Aos **pacientes** e seus **familiares**, pelo respeito, confiança e carinho e a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta pesquisa, minha profunda gratidão.

"A voz dos livros pode ser ouvida por muitos anos".

(Max Lener)

RESUMO

Perdiza, M. Avaliação da contaminação microbiana de aparelhos ortodônticos removíveis, com e sem utilização de agente antimicrobiano, pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* – Estudo clínico randomizado. [dissertação]. Ribeirão Preto: FORP – Universidade de São Paulo; 2009.

O objetivo do presente estudo clínico randomizado foi avaliar *in vivo*, por meio da técnica de biologia molecular *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*: 1) A contaminação de aparelhos ortodônticos removíveis por 40 espécies bacterianas; 2) A eficácia da utilização do gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard®) sobre microrganismos cariogênicos; e 3) A eficácia da utilização do gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard®) sobre microrganismos periodontopatogênicos dos complexos laranja e vermelho. Participaram do estudo 20 pacientes de 7 a 11 anos de idade, em tratamento com aparelhos ortodônticos removíveis. O estudo constou de 2 etapas, com intervalo de 15 dias entre cada uma, de forma que todos os pacientes participassem tanto do grupo controle, quanto do grupo experimental. Em cada etapa os pacientes receberam um novo aparelho (totalizando 2 aparelhos por indivíduo) e um frasco plástico contendo a solução a ser borrifada sobre os aparelhos, porém os indivíduos não sabiam qual solução estavam utilizando. Os aparelhos foram utilizados em período integral, inclusive à noite, sendo removidos apenas durante as refeições. Os pacientes do Grupo Controle foram orientados a usar solução placebo, sob a forma de spray, 2 vezes por semana, por 7 dias. Os pacientes do Grupo Experimental foram orientados a usar solução à base de gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard®) sob a forma de spray, da mesma forma que o grupo Controle. Decorridos 7 dias, os aparelhos de cada etapa foram removidos e processados para detecção de 40 espécies bacterianas, incluindo microrganismos cariogênicos e periodontopatogênicos, pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Os resultados obtidos foram analisados por meio do teste não-paramétrico de Wilcoxon, utilizando o software *SAS (Statistical Analysis System)*. O nível de significância adotado foi de 5%. De acordo com os resultados obtidos observou-se que os aparelhos ortodônticos removíveis dos pacientes do grupo controle estavam densamente contaminados pelos microrganismos avaliados. A maioria das sondas utilizadas estava presente nas amostras desse grupo, sendo que *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. gordonii* e *E. corrodens* ocorreram em 100% dos aparelhos. Dentre os microrganismos cariogênicos, *S. mutans* e *S. sobrinus* foram encontrados em maiores quantidades que *L. acidophilus* e *L. casei*. As bactérias periodontopatogênicas pertencentes ao complexo vermelho foram evidenciadas em maiores quantidades que as pertencentes ao complexo laranja. Dentre os demais complexos não associados com patologias específicas, o complexo roxo apresentou-se em maiores quantidades, estando presente em 34% das amostras. Após o uso de spray com gluconato de clorexidina a 0,12%, observou-se uma diminuição significativa dos microrganismos cariogênicos (*S. mutans* e *S. sobrinus* e *L. acidophilus*) nos aparelhos ortodônticos removíveis ($p < 0,05$). Observou-se também uma diminuição significativa de todos os microrganismos periodontopatogênicos dos complexos laranja e vermelho ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle, com exceção apenas do *T. socranskii*. Conclui-se que os aparelhos ortodônticos removíveis encontraram-se multicolonizados por diversas espécies bacterianas e que a clorexidina, utilizada duas vezes por semana sob a forma de spray, foi eficaz na redução dos níveis de microrganismos cariogênicos e periodontopatogênicos dos complexos laranja e vermelho, nesses aparelhos.

Palavras-chave: *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, Clorexidina, Aparelhos ortodônticos removíveis, Desinfecção, Biologia Molecular.

ABSTRACT

Perdiza, M. Detection of microbial contamination of removable orthodontic appliances with or without use of antimicrobial agent, by the Checkerboard DNA-DNA Hybridization, – A randomized clinical study. [Dissertação]. Ribeirão Preto: FORP – Universidade de São Paulo; 2009.

Using the Checkerboard DNA-DNA Hybridization biomolecular technique, this randomized clinical study evaluated: 1) the contamination of removable orthodontic appliances by 40 bacterial species; 2) the efficacy of 0.12% chlorhexidine gluconate (Periogard®) spray against cariogenic microorganisms; and 3) the efficacy of 0.12% chlorhexidine gluconate spray against periodontopathogenic microorganisms of the orange and red complexes. Twenty 7-11-year-old patients under treatment with removable orthodontic appliances were enrolled. The study had two phases, with a 15-day interval between them, in such a way that patients participated both in the control and in the experimental group. In each phase, the patients received a new appliance (total of 2 appliances *per* patient) and a bottle containing a solution to be sprayed onto the appliances, but they were blinded to whether it was a placebo solution or an antimicrobial agent. The patients were instructed to wear the appliances full-time, even at night, removing only at meals. The patients in the control and experimental groups were instructed to spray the placebo or the 0.12% chlorhexidine gluconate-based solution (Periogard®), respectively, onto the appliances twice a week during 7 days. After this period, the appliances of each phase were collected and processed for detection of 40 bacterial species, including cariogenic and periodontopathogenic microorganisms by the Checkerboard DNA-DNA Hybridization technique. Data were analyzed statistically by the non-parametric Wilcoxon test using the SAS software (Statistical Analysis System) at 5% significance level. The results showed that the removable orthodontic appliances of the patients in the control group were heavily contaminated by the target microorganisms. Most bacterial probes used were present in the control samples, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. gordonii* and *E. corrodens* being detected in 100% of the appliances. Among the cariogenic microorganisms, *S. mutans* and *S. sobrinus* were found in larger numbers than *L. acidophilus* and *L. casei*. The number of red complex periodontopathogenic bacteria was larger than that of orange complex periodontopathogenic bacteria. Among the other bacterial complexes not associated with specific pathologies, purple complex bacteria were present in larger numbers, being detected in 34% of the samples. After use of the 0.12% chlorhexidine gluconate spray, the number of the cariogenic microorganisms (*S. mutans*, *S. sobrinus* and *L. acidophilus*) decreased significantly in the removable orthodontic appliances ($p < 0,05$). There was also a significant decrease in the numbers of all periodontopathogenic microorganisms of the orange and red complexes ($p < 0,05$), compared to the control group, except for *T. socranskii*. In conclusion, the removable orthodontic appliances were multicolonized by several bacterial species, and the use of chlorhexidine spray twice a week was effective in reducing the levels of cariogenic and periodontopathogenic microorganisms of the orange and red complexes.

Key Words: *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, Chlorhexidine, Removable orthodontic appliances, Disinfection, Molecular Biology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 PROPOSIÇÃO.....	18
3 MATERIAL E MÉTODO.....	20
3.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	21
3.2 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	21
3.3 CONFECÇÃO DOS APARELHOS ORTODÔNTICOS	22
3.4 INSTALAÇÃO DOS APARELHOS ORTODÔNTICOS REMOVÍVEIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	22
3.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DOS APARELHOS ORTODÔNTICOS REMOVÍVEIS.....	24
3.6 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	26
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4 RESULTADOS.....	36
4.1 DA ALEATORIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS.....	37
4.2 DA OCORRÊNCIA DE 40 ESPÉCIES DE MICRORGANISMOS NOS APARELHOS ORTODÔNTICOS REMOVÍVEIS.	38
4.3 DA EFICÁCIA DA CLOREXIDINA SOBRE MICRORGANISMOS CARIOGÊNICOS.....	41
4.4 DA EFICÁCIA DA CLOREXIDINA SOBRE MICRORGANISMOS PERIODONTOPATOGÊNICOS DOS COMPLEXOS LARANJA E VERMELHO.....	43
5 DISCUSSÃO.....	47
5.1 DA METODOLOGIA.....	48
5.2 DOS RESULTADOS	52
6 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICES.....	77
ANEXO.....	82

1 INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é um ecossistema bastante diversificado, com mais de 600 espécies microbianas colonizando as diferentes superfícies que a compõem (Papaioannou et al., 2009), as quais coexistem em equilíbrio com o hospedeiro em condições de normalidade (Fejerskov e Kidd, 2005). No entanto, quando ocorrem modificações nesse ambiente, a microbiota também sofre alterações, resultando em desequilíbrio na homeostase e possibilidade do desenvolvimento de doenças (Marsh, 2006).

O tratamento ortodôntico por meio do uso de aparelhos fixos e removíveis ocasiona alterações específicas no meio bucal (Anhoury et al., 2002; Lee et al., 2005; Brusca et al., 2007), incluindo redução do pH, aumento no acúmulo de biofilme dental (Gorelick et al., 1982; Naranjo et al., 2006) e elevação dos níveis salivares de microrganismos (Mattingly et al., 1983; Rosenbloom e Tinanoff, 1991; Leung et al., 2006; Sari e Birinci, 2007). Esse fato ocorre pois os aparelhos ortodônticos são compostos por uma variedade de materiais sólidos e elásticos (Steinberg e Eyal, 2004), com superfícies irregulares incluindo bráquetes, acrílico, bandas, fios e outros acessórios, as quais funcionam como áreas de retenção de biofilme bacteriano (Leung et al., 2006; Lessa et al., 2007; Bagatin-Rossi, 2007; Ahn et al., 2007; Magno et al., 2008). Além disso, dificultam a higienização (Olympio et al., 2006; Faltermeier et al., 2008) e limitam a ocorrência da auto-limpeza mecânica ocasionada pela saliva e pela movimentação da musculatura (Rosenbloom e Tinanoff, 1991).

Na literatura específica, poucos estudos têm avaliado a contaminação bacteriana de aparelhos ortodônticos removíveis (Diedrich, 1989; Amitha e Munshi, 1995; Brook e Gober, 1998; Batoni et al., 2001; Lessa et al., 2007; Peixoto et al., 2009). O uso desses aparelhos para pequenos movimentos dentários, contenção e terapia miofuncional, resulta em um maior acúmulo de biofilme dental sobre superfícies e sítios retentivos de grampos, molas e base acrílica (Nyvad, 1993; Batoni et al., 2001; Lessa et al., 2007; Peixoto et al., 2009). Posteriormente, há alteração na microbiota bucal, pois as superfícies de qualquer aparelho usado na boca, por um

determinado período, torna-se colonizado por microrganismos (Houston e Isaacson, 1980).

O maior acúmulo de microrganismos, com elevação dos seus níveis salivares e maior deposição do biofilme após instalação de aparelhos ortodônticos, implica no aumento do risco à cárie dental e à doença periodontal (Ärtun e Brobakken, 1986; Anhoury et al., 2002; Naranjo et al., 2006; Sudjalim et al., 2007; Consolaro e Consolaro, 2008; Lo et al., 2008), com possibilidade da ocorrência de alterações inflamatórias na mucosa, particularmente do palato (Martins-Ortiz et al., 2003), além de invasão de células da mucosa por microrganismos (Leung et al., 2006).

Os microrganismos se organizam sob a forma de biofilme, podendo se aderir aos aparelhos ortodônticos removíveis, particularmente sobre a superfície de acrílico dos mesmos, a qual se apresenta com inúmeras porosidades que podem atuar como nichos para a colonização bacteriana (Morgan e Wilson, 2000; Martins-Ortiz et al., 2004; Lessa et al., 2007).

Em Ortodontia, a contaminação microbiana da superfície de componentes específicos de aparelhos ortodônticos fixos e removíveis tem sido avaliada empregando, na maioria das vezes, técnicas de cultura microbiana (Brook e Gober, 1998; Batoni et al., 2001; Brêtas et al., 2005; Papaioannou et al., 2007; Lessa et al., 2007; Brusca et al., 2007; Bagatin-Rossi, 2007; Magno et al., 2008; Maruo et al., 2008; Peixoto et al., 2009). Além disso, os estudos têm focado, particularmente, os microrganismos cariogênicos (Batoni et al., 2001; Steinberg e Eyal, 2004; Brêtas et al., 2005; Brusca et al., 2007; Ahn et al., 2007; Lessa et al., 2007; Bagatin-Rossi, 2007; Papaioannou et al., 2007; Lim et al., 2008; Magno et al., 2008; Faltermeier et al., 2008; Maruo et al., 2008; Peixoto et al., 2009).

Com relação aos microrganismos cariogênicos observa-se que, em humanos, os *S. mutans* são mais frequentemente isolados que os *S. sobrinus* (Loesche, 1986). Os *S. sobrinus* são mais sacarose-dependentes que os *S. mutans* (Gibbons et al., 1986) e apresentam maior capacidade de produção de ácidos (De Soet et al., 1989; Saito et al., 2009). Além disso, a coexistência de *S. mutans* e *S. sobrinus* parece ser um importante fator no desenvolvimento da cárie dental (Lindquist e Emilson, 1991), uma vez que quando ambas as espécies estão presentes

na cavidade bucal, evidencia-se maior experiência de cárie nos indivíduos que quando se detecta apenas *S. mutans* (Köhler e Bjarnason, 1987; Seki et al., 2006).

Por outro lado, os *Lactobacillus* colonizam a cavidade bucal no primeiro ano de vida (Badet e Thebaud, 2008) e estão presentes na saliva, no dorso da língua, nas membranas mucosas, no palato duro e no biofilme dental (Socransky e Maganiello, 1971; Straetemans et al., 1998). A presença de *Lactobacillus* na cavidade bucal depende, dentre outros fatores, da presença de nichos ecológicos, como anfractuosidades dentais (Loesche et al., 1984; Badet e Thebaud, 2008), molares parcialmente irrompidos e acessórios ortodônticos (Sakamaki e Bahn, 1968; Meurman et al., 1987; Lundstrom e Krasse, 1987; Botha, 1993; Chang et al., 1999), os quais favorecem a retenção e o desenvolvimento desses microrganismos (Meurman et al., 1987; Tanzer et al., 2001).

Uma forte correlação tem sido estabelecida entre os níveis de *Lactobacillus* e o desenvolvimento de lesões de cárie (Badet e Thebaud, 2008), em função da produção de ácidos, que reduzem o pH do meio (Rosen et al., 1968) e por apresentarem a capacidade de sobreviver em ambientes com pH ácido (Badet et al., 2001), à semelhança do que ocorre com os *S. mutans* e *S. sobrinus*.

Alguns autores têm relatado que o uso de aparelhos ortodônticos promove, também, o aumento de patógenos periodontais no biofilme supra (Sallum et al., 2004) e subgingival (Sallum et al., 2004; Lee et al., 2005; Thornberg et al., 2009), os quais estão diretamente relacionados com a inflamação gengival observada com frequência durante o tratamento ortodôntico (Sallum et al., 2004, Lee et al., 2005). Em 2008, Haffajee et al. dividiram os microrganismos encontrados no biofilme supragengival nos chamados "complexos microbianos" laranja, vermelho, amarelo, verde e roxo, e grupo dos *Actinomyces*. De acordo com esses autores, os microrganismos pertencentes aos complexos vermelho e laranja estão altamente associados com a doença periodontal.

No entanto, o maior acúmulo de microrganismos na cavidade bucal não implica apenas no aumento do risco a doenças como a cárie dental e a doença periodontal (Anhoury et al., 2002; Lo et al., 2008) mas também na possível ocorrência de complicações sistêmicas (Li et al., 2000; Marques da Silva et al., 2005; Gurenlian, 2009; Higashi et al., 2009).

Considerando que determinados procedimentos ortodônticos podem levar a bacteriemias transitórias (Lucas et al., 2002; Rosa et al., 2005; Gurel et al., 2009), cuidados adicionais tornam-se necessários, como o uso de agentes antimicrobianos durante o tratamento ortodôntico, ou até mesmo a necessidade de antibioticoterapia profilática em casos específicos, para preservar a saúde geral do paciente, principalmente daqueles com algum comprometimento sistêmico (Lucas et al., 2002; Rosa et al., 2005).

Apesar do exposto, deve-se ressaltar que nunca houve uma análise das conseqüências sistêmicas do uso de aparelhos contaminados por longos períodos de tempo. Na realidade, na prática clínica da Ortodontia sequer valoriza-se, registra-se ou mensura-se um provável aumento na ocorrência primária ou recorrente de gripes, resfriados, candidoses, irritações da mucosa, amidalites e outras infecções oportunistas durante o tratamento ortodôntico (Martins-Ortiz et al., 2004).

Nos últimos anos, com o advento das novas técnicas de biologia molecular, avanços ocorreram na área da Microbiologia, tornando possível a identificação de espécies bacterianas de maneira mais confiável, por meio de sondas de DNA. Dentre as técnicas de biologia molecular destaca-se a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, preconizada por Sockransky, em 1994, e empregada em Odontologia nas áreas de Periodontia (Teles et al., 2008; Matarazzo et al., 2008; Ioannou et al., 2009; Adriaens et al., 2009), Endodontia (Vianna et al., 2008; Siqueira e Rôças, 2009), Implantodontia (Máximo et al., 2009; Nascimento et al., 2009), Odontopediatria (Ruvierre et al., 2007; Youravong et al., 2007; Gizani et al., 2009) e Cariologia (Filoche et al., 2008; Papaioannou et al., 2009), entre outras.

A técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* é um método de diagnóstico que oferece vantagens em relação aos métodos tradicionais de cultura microbiana, incluindo a detecção de microrganismos de desenvolvimento lento, nutricionalmente exigentes ou fastidiosos, além da detecção da microbiota não cultivável. É também um método mais rápido que o empregado na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), pois utiliza várias sondas de DNA de uma única vez (Siqueira et al., 2000; Moraes et al., 2002).

Na área da Ortodontia, a técnica de biologia molecular *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi empregada, até o momento, em apenas um estudo piloto

efetuado por Anhoury et al. (2002), para avaliar a contaminação bacteriana de bráquetes metálicos e cerâmicos.

Por outro lado, para a prevenção e controle da instalação de processos patológicos na cavidade bucal, embora os métodos de higiene bucal nos pacientes portadores de aparelhos ortodônticos devam ser enfatizados (Naranjo et al., 2006; Lim et al., 2008), em crianças, jovens e idosos a destreza manual e o cuidado com a higiene bucal, na maior parte das vezes, são fatores que comprometem o controle mecânico do biofilme (Dills et al., 1988). Adicionalmente, a escovação é ineficaz na remoção de microrganismos das áreas retentivas dos aparelhos (Diedrich, 1989) e, segundo Smiech-Slombowska e Jablonska-Zrobek (2007), embora a escovação e o uso do fio dental sejam de fundamental importância, essas medidas não reduzem os níveis salivares de *S.mutans* e de *Lactobacillus*, em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos.

Em função disso, vários autores têm preconizado o uso de agentes antimicrobianos, principalmente sob a forma de bochechos, sprays ou vernizes, como coadjuvantes no controle do biofilme dental e do biofilme dos aparelhos ortodônticos (Fardal e Turnbull, 1986; Brightman et al., 1991; Amitha e Munshi, 1995; Lessa et al., 2007; Sari e Birinci, 2007; Bagatin-Rossi, 2007; Maruo et al., 2008; Alves et al., 2008; Derks et al., 2008; Peixoto et al., 2009). Um enfoque especial tem sido dado à clorexidina, considerada o antimicrobiano "padrão ouro", quando comparada aos demais agentes disponíveis no comércio especializado (Mosrefi, 2002).

No entanto, até o momento, não há estudos publicados avaliando a composição da microbiota de aparelhos ortodônticos removíveis, com e sem o uso de agentes antimicrobianos, empregando técnicas de biologia molecular como o *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

2 PROPOSIÇÃO



2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo clínico duplo-cego cruzado e placebo-controlado foi avaliar *in vivo*, por meio da técnica de biologia molecular *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, em aparelhos ortodônticos removíveis de crianças:

- A ocorrência de 40 espécies de microrganismos, por meio de sondas de DNA, uma semana após sua instalação na cavidade bucal.

- A eficácia da utilização do gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard[®]), sob a forma de spray, na redução da contaminação por 4 espécies de microrganismos cariogênicos.

- A eficácia da utilização do gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard[®]), sob a forma de spray, na redução da contaminação por 17 espécies de microrganismos periodontopatogênicos dos complexos laranja e vermelho.

3 MATERIAL E MÉTODOS



3 Material E Método

3.1 Seleção da amostra

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (processo nº 2008.1.163.58.8 – Anexo A) foi obtido o consentimento livre e esclarecido dos responsáveis que fizeram parte da pesquisa. Foram selecionados 20 pacientes de 7 a 11 anos de idade (média de 9 anos), de ambos os gêneros, com dentição mista, que compareceram na clínica de Ortodontia do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, necessitando de tratamento empregando aparelhos ortodônticos removíveis.

Esses indivíduos não poderiam ter feito uso de antibióticos e/ou bochechos com soluções antimicrobianas por um período mínimo de 3 meses, previamente ao início da pesquisa. Além disso, deveriam apresentar boa saúde geral, verificada por meio de anamnese detalhada, não devendo apresentar, no momento da realização da pesquisa, alterações sistêmicas significativas que pudessem interferir na realização do estudo.

3.2 Divisão dos grupos experimentais (randomização)

Os 20 pacientes selecionados foram aleatoriamente divididos em dois grupos (Controle e Experimental) de 10 pacientes cada, com o auxílio do programa *SAS (Statistical Analysis System) for Windows* versão 9.1.3.(SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) seguindo o protocolo "cross-over" randômico.

Os pacientes selecionados foram moldados com alginato Jeltrate (Dentsply Indústria e Comércio, Petrópolis, Brasil) utilizando-se moldeira ortodôntica. Após a desinfecção da moldagem com spray de hipoclorito de sódio a 1%, por 10 minutos, os moldes foram vazados com gesso pedra branco tipo α especial (Empresa e Indústria Gesso Mossoró SA, Rio de Janeiro, Brasil), obtendo-se os modelos de gesso.

3.3 Confeção dos aparelhos ortodônticos

Foram confeccionados aparelhos ortodônticos, compostos por uma placa de resina e grampos confeccionados de fios de aço inoxidável Remanium 0,7mm (Dentaurum, Germany) com ancoragem nos dentes posteriores (primeiros molares permanentes). O modelo de gesso foi isolado com Cel-Lac (S.S. White Artigos Odontológicos, Rio de Janeiro, Brasil) para a aplicação da resina acrílica autopolimerizável Ortoclass (Artigos Odontológicos Clássicos Ltda., São Paulo, Brasil), seguindo a proporção monômero/polímero recomendada pelo fabricante. O modelo foi, então, colocado em panela sob pressão (Polimerizador para acrílico- VH Softiline, Araraquara, Brasil) durante 15 minutos, para evitar a formação de bolhas durante a polimerização.

Em seguida, foi realizado o recorte e acabamento do aparelho, utilizando fresa de tungstênio em motor com peça de mão para baixa rotação. Para acabamento e regularização da superfície, foram utilizadas lixas para madeira nº 180 e lixas d'água nº 400 e 600, montadas em mandris e motor de baixa rotação com peça de mão. O polimento do aparelho foi realizado inicialmente com uma escova de pêlos em forma de roda, montada em torno para polimento, utilizando-se baixa velocidade e uma pasta de pedra-pomes em pó e água, seguido de uma roda de tecido. O aparelho foi lavado com água e sabão para eliminar o excesso de pedra-pomes. O acabamento final foi realizado em polidora química (PQ 9000 Termotron, Piracicaba, Brasil) aumentando, assim, o brilho e a lisura da superfície do acrílico.

3.4 Instalação dos aparelhos ortodônticos removíveis e procedimentos experimentais

Os pacientes receberam instruções de higiene bucal, sendo orientados a escovar os dentes e o aparelho 3 vezes ao dia com a escova dental Professional® (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, SP, Brazil) e dentifrício fluoretado Colgate Máxima Proteção Anticáries® (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, SP, Brazil), oferecidos pelos pesquisadores durante o período do experimento. Para

cada aparelho utilizado foi fornecido um borrifador de 100 ml contendo a solução indicada para aquele paciente.

A fim de minimizar a interferência de fatores de confusão nos resultados obtidos, na primeira etapa do estudo 10 pacientes usaram os aparelhos removíveis, constituídos por placas de resina acrílica e grampos de retenção, por um período de 1 semana, sendo orientados a utilizar dentifrício fluoretado para escovação dental diária e a não utilizar agentes antimicrobianos, borrifando o aparelho com solução placebo manipulada (Farmácia de manipulação Doce Erva, Ribeirão Preto, Brasil) com cor, sabor e composição semelhantes ao Periogard[®] (glicerina 10 %, polissorbato 0,5%, essência de menta 0,05%, sacarina 0,05%, corante azul 1 x 0,25% e água destilada qsp 1000 ml), porém sem adição de clorexidina em sua composição, sob a forma de spray à noite, no 4^o e 7^o dias após a instalação do aparelho (Grupo Controle). Os outros 10 pacientes foram orientados, além da escovação diária com dentifrício fluoretado, a efetuar a desinfecção do aparelho removível, por meio do uso de spray de Gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard[®] – Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil), à noite, no 4^o e 7^o dias após a instalação do aparelho (Grupo Experimental), como sugerido por Peixoto et al. (2009). No 8^o dia, os aparelhos foram recolhidos, para processamento e análise.

Após um período de *wash out* de 15 dias, os pacientes receberam novos aparelhos, sendo que os pacientes que participaram do Grupo Controle foram submetidos ao protocolo do Grupo Experimental e vice-versa, totalizando, ao final do estudo, 20 aparelhos sem uso de solução antimicrobiana (Grupo Controle) e 20 aparelhos com o uso de solução antimicrobiana (Grupo Experimental).

Portanto, cada paciente utilizou dois aparelhos ortodônticos, de tal modo que, em momentos diferentes, os 20 pacientes participaram de ambos os grupos (Controle e Experimental).

As soluções empregadas para a realização da desinfecção nos grupos Controle e Experimental foram acondicionadas em frascos de plástico de 120 ml e fornecidas aos pacientes no mesmo dia da colocação do aparelho ortodôntico removível. Os pacientes não tiveram conhecimento de qual das duas soluções

(placebo ou antimicrobiana) estavam utilizando, quando estavam efetuando a desinfecção dos aparelhos.

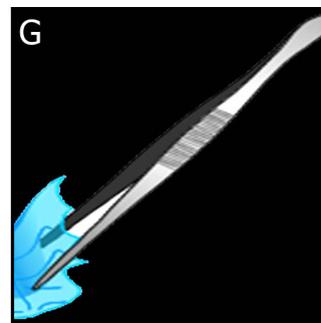
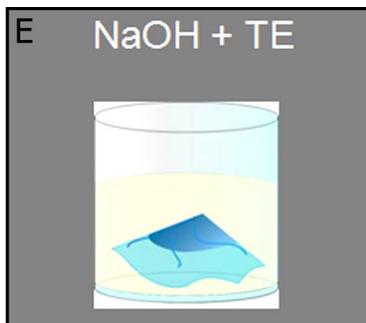
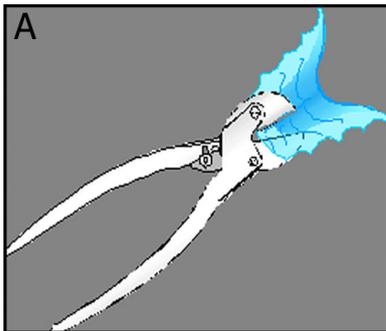
Todos os procedimentos clínicos foram realizados por um único operador (cirurgião-dentista).

3.5 Processamento das amostras dos aparelhos ortodônticos removíveis

Cada aparelho ortodôntico removível foi cortado em três partes (figura 1 A e B) e colocado em um coletor universal esterilizado de 100 ml (Pleion Indústria e Comércio de Plásticos Ltda, Barueri, São Paulo - figura C) onde foi adicionado 9 ml de solução tampão TE (pH=7,6) e 6 ml de NaOH a 0,5 M, (figura D e E) codificados e agitados em aparelho Mixtron (Toptronix, São Paulo, Brasil – figura F) em velocidade máxima, durante 30 segundos, para dessorção do material. A seguir, as partes do aparelho ortodôntico foram removidas com pinça clínica esterilizada (figura G) e a solução contendo a suspensão bacteriana foi transferida para um tubo Corning de 15 ml (Hexasystens, São Paulo, Brasil - figura H). As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 12 minutos (Ependorff-5810R, São Paulo, Brasil). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em 150 ul de TE e 100 ul de NaOH, sendo a suspensão novamente agitada por 30 segundos e congelada a -20°C para que, oportunamente, fossem submetidas à técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

FIGURA 1 - Processamento das amostras dos aparelhos ortodônticos removíveis

- A, B - Remoção do aparelho ortodôntico removível e divisão em três partes.
- C, D, E- Transferência do aparelho ortodôntico removível para o coletor universal onde foi adicionado 9 ml de solução tampão TE e 6 ml de NaOH a 0,5 M.
- F - Agitação em aparelho Mixtron (Toptronix), durante 30 segundos, para dessorção do material.
- G - Remoção do aparelho com pinça clínica estéril e transferência da suspensão bacteriana obtida para o tubo corning de 15 ml.
- H- Tubos Corning contendo as amostras.



3.6 Procedimentos laboratoriais

Cepas bacterianas e condições de crescimento

O processamento/análise das amostras foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II, Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular da Universidade de Guarulhos - SP.

A relação das 40 cepas bacterianas utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA está apresentada na Tabela 1. As cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD, EUA) ou do *Forsyth Institute* (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em ágar-triptose de soja (Difco) contendo 5% de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar-triptose de soja com 5% de sangue desfibrinado de ovelha e 10 µg/ml de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de ovelha, 0,3 µg/ml de menadiona (Sigma) e 5 µg/ml de hemina (Sigma). As espécies *T. denticola* e *T. socranskii* foram cultivadas em caldo para crescimento de *Mycoplasma* suplementado com 1 mg/ml de glicose (Sigma), 400 µg/ml de niacinamida (Sigma), 150 µg/ml de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/ml de isobutirato de sódio (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), 1 mg/ml de L-cisteína (Sigma), 5 µg/ml de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

Tabela 1 - Cepas bacterianas empregadas para a obtenção das sondas de DNA

Microrganismo	Cepa
Bactérias cariogênicas	
<i>Streptococcus mutans</i>	25175 ^a
<i>Streptococcus sobrinus</i>	33748 ^a
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4356 ^a
<i>Lactobacillus casei</i>	393 ^a
Grupo dos Actinomyces	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 ^a
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104 ^a
<i>Actinomyces naeslundii II</i>	43146 ^a
<i>Actinomyces odontolyticus I</i>	17929 ^a
Complexo roxo	
<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a
Complexo amarelo	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans a + b</i>	43718 ^a
	29523 ^a
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 ^a
	11827 ^a
<i>Propionibacterium acnes I + II</i>	11828 ^a
<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 ^a
<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 ^a
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 ^a
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 ^a
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 ^a
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 ^a
Complexo verde	
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 ^a
Complexo laranja	
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a
<i>Campylobacter showae</i>	51146 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum ss nucleatum</i>	25586 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum ss vincentii</i>	49256 ^a
<i>Fusobacterium nucleatum ss polymorphum</i>	10953 ^a
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a
<i>Selenomonas noxia</i>	43541 ^a
Complexo vermelho	
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b

As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos e Grupo dos *Actinomyces* descritos por Haffajee et al. (2008) e bactérias cariogênicas.

^a ATCC (American Type Culture Collection).

^b Forsyth Institute, Boston, MA.

Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram cultivadas em anaerobiose no meio ágar-sangue, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrífuga de 1,5 ml contendo 1 ml de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução-tampão de TE por 10 minutos. Em seguida, os sedimentos bacterianos das cepas Gram-negativas foram novamente suspensos e lisados com SDS (dodecilsulfato de sódio, $C_{12}H_{25}NaO_4S$, Labsynth) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20 mg/ml. Os sedimentos das cepas de bactérias Gram-positivas foram lisados em 150 μ l de uma mistura enzimática contendo 15 mg/ml de lizozima (Sigma) e 5 mg/ml de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al. (1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1 μ g do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *Random Primer Digoxigenin Labeling Kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por Feinberg e Vogelstein (1983).

Checkerboard DNA-DNA Hybridization

As amostras oriundas dos aparelhos ortodônticos removíveis foram avaliadas utilizando-se a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, preconizada por Socransky et al., em 1994. As suspensões contidas nos tubos plásticos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos (figura 2 A) e, em seguida, neutralizadas pela adição de 800 μ l de acetato de amônia a 5 M (figura 2 B). Cada suspensão contendo o DNA livre das bactérias presentes nas amostras dos aparelhos ortodônticos removíveis foi depositada em uma das canaletas do aparelho *Minislot* 30 (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e transferida para a membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA – figura 2 C, D e E). As duas últimas das 30 canaletas horizontais do *Minislot* foram usadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 1 ng e 10 ng de DNA de cada espécie, respectivamente. A

membrana foi removida do *Minislot* 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 min (figura 2 F).

A membrana foi pré-hibridada a 42°C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 x solução salina citratada (SSC) [1 x SSC= 150mM NaCl (Vetec), 15M de citrato de sódio (J.T.Baker, Edo. de Méx., México), pH 7,0], 25 mM de fosfato de sódio (Na₂HPO₄, Labsynth), pH 6,5 e 0,5 mg/ml de RNA de levedura (Sigma – figura 2 G).

Em seguida a membrana foi posicionada no *Miniblotter* 45 (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato (figura 2 H). Em cada canaleta do *Miniblotter* 45 foi adicionada uma sonda de DNA (Figura 2 I), diluída a aproximadamente 20 ng/ml, em 130 µl de solução de hibridação composta de 45% formamida, 5 x SSC, 20mM de Na₂HPO₄ (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano (Amersham) e 1% de caseína. Para a hibridação, aguardou-se um período mínimo de 20 horas, a 42°C (figura 3 A).

Deteccção das espécies

Após o período de hibridação, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45, lavada por 40 minutos a 65°C numa solução de alta adstringência (solução tampão SSC a 0,4 M – figura 3 B) composta por 1% de SDS, 1 mM de EDTA e 20mM de Na₂HPO₄, a fim de remover sondas que não hibridaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maléico (C₄H₄O₄, Vetec), 3 M NaCl, 0,2 M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína, pH 8,0 (figura 3 C), e, em seguida, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche – figura 3 D) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi, então, lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1 M de ácido maléico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0 (figura 3 E), e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1 M de NaCl, pH 9,5.

FIGURA 2 - Resumo das etapas da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

- A - Fervura das amostras em banho-maria por 10 minutos.
- B - Neutralização das suspensões das amostras pela adição de 800 µL de acetato de amônia a 5 M.
- C - *Minislot-30*.
- D - Introdução da membrana de nylon (15 x 15 cm) e papéis de filtro no interior do *Minislot-30*.
- E - Deposição das amostras oriundas dos aparelhos ortodônticos removíveis nas canaletas do *Minislot-30*.
- F - Exposição da membrana à 120°C por 20 minutos, para fixação do DNA.
- G - Pré-Hibridização da membrana a 42°C por 1 hora.
- H - Introdução da membrana no *Miniblotter-45* evidenciando as canaletas perpendiculares às linhas com o DNA das amostras.
- I - Preenchimento das canaletas do *Miniblotter-45* com as sondas de DNA marcadas com digoxigenina.

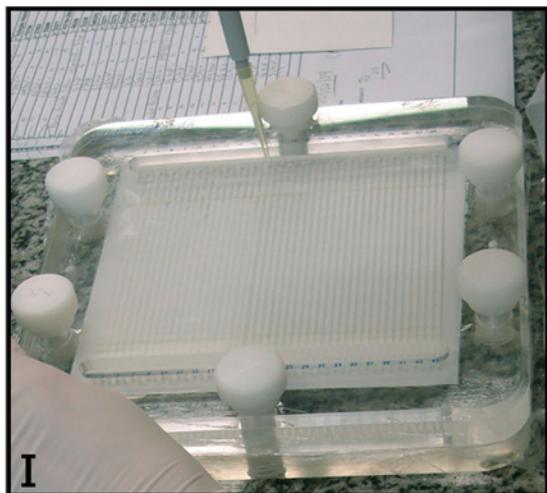
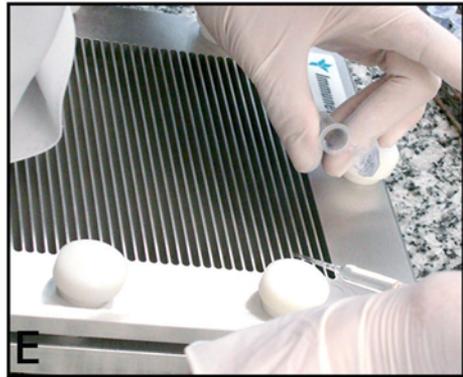
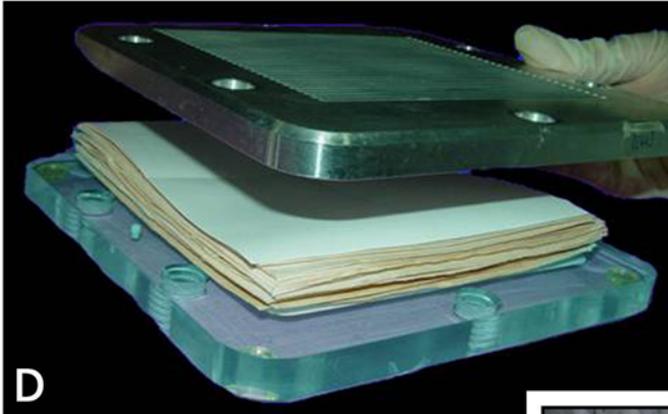
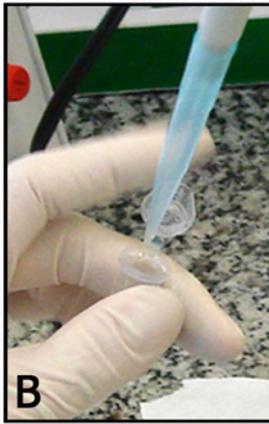
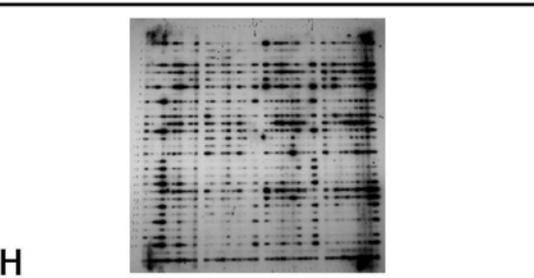
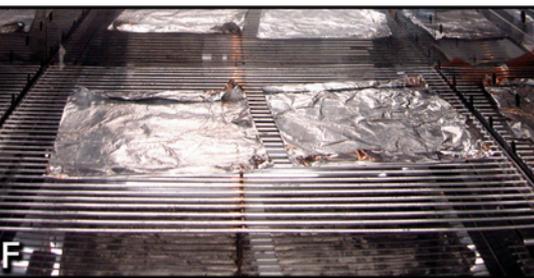


FIGURA 3 - Resumo das etapas da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* (continuação).

- A - Hibridização em *buffer* de Formamida a 42°C por 20 horas.
- B- Lavagem de alta adstringência em solução tampão SSC 0,4 M a 65°C por 40 minutos, para a remoção das sondas que não hibridizaram completamente.
- C - Imersão por 1 hora em solução de bloqueio.
- D - Acréscimo do anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina.
- E - Lavagem da membrana em solução específica para remoção de excessos do anticorpo.
- F - Incubação da membrana a 37°C, por 45 minutos, em solução *CDP-Star™ Detection Reagent*, contendo substrato para fosfatase alcalina.
- G - Cassete de autoradiografia contendo o filme radiográfico.
- H - Filme radiográfico com os sinais de quimioluminescência.



As figuras 4 e 5 representam, esquematicamente, o *Minislot 30* (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras na membrana de nylon (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*), e o *Miniblotter 45* (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridação e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

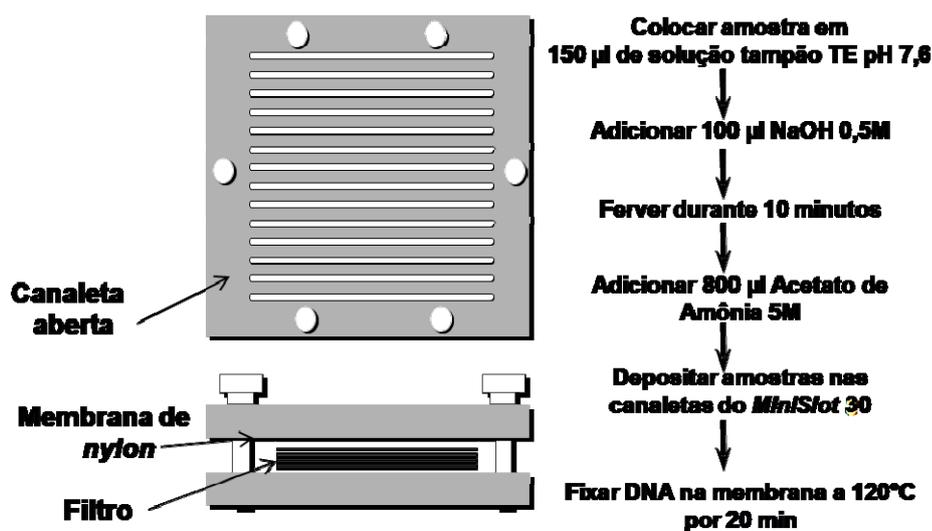


Figura 4 - Representação esquemática do Minislot 30 (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras na membrana de nylon (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

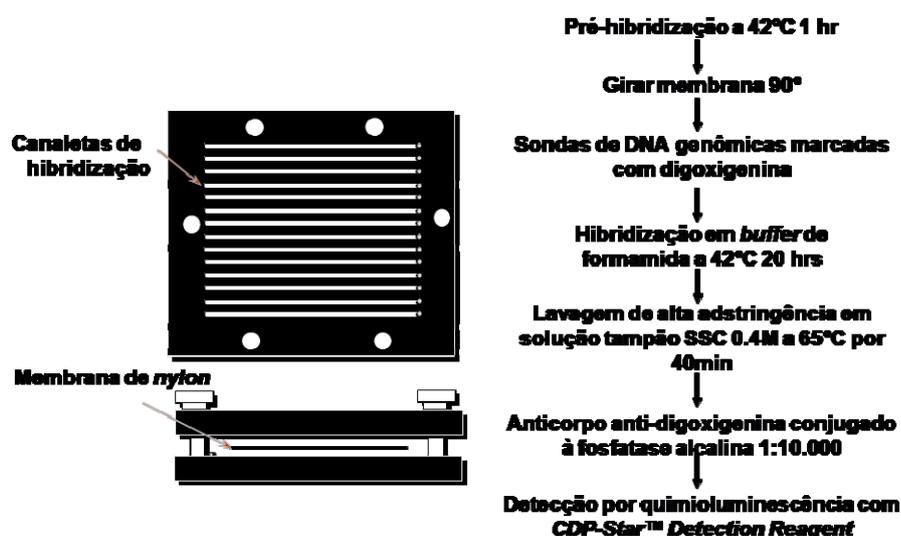


Figura 5 - Representação esquemática do Miniblotter 45 (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridação e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

Para a detecção dos sinais de quimioluminescência a membrana foi incubada por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, CDP-Star™ Detection Reagent (Amersham – Figura 3 F). Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete de autoradiografia (Chassi Radiográfico 30 x 40 cm, Konex, São Paulo, SP, Brasil), sobre um filme radiográfico 18 x 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por, aproximadamente, 40 minutos (Figura 3 G). O filme foi revelado manualmente pelo método convencional tempo-temperatura, de acordo com orientações do fabricante, empregando soluções Kodak (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil), mantidas à temperatura de 20°C.

Desta forma, foi obtido um filme radiográfico com os sinais de quimioluminescência detectados pelas sondas de DNA, onde as linhas horizontais representam as amostras e as verticais as sondas de DNA, propiciando um formato de “tabuleiro de xadrez” (figura 3 H e 6).

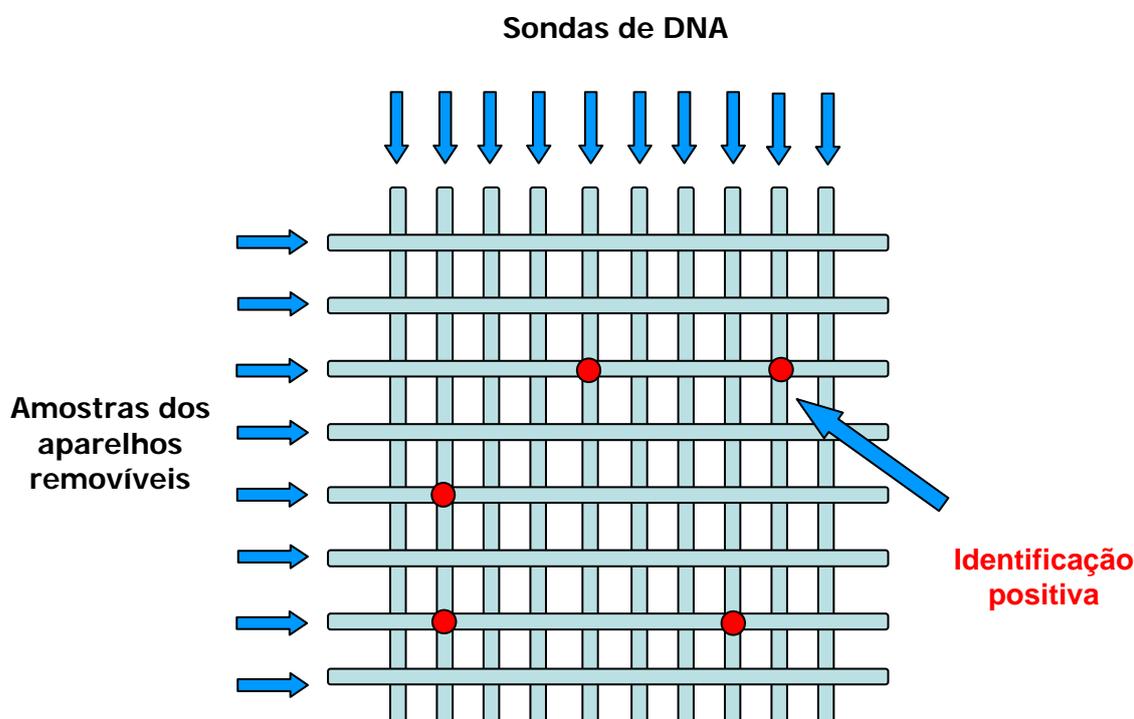


Figura 6 - Representação esquemática do padrão de Hibridação entre as bactérias presentes nas amostras e as sondas de DNA (Técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador calibrado ($Kappa > 0,8$) e cego com relação aos grupos avaliados. A leitura foi realizada 2 vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Quando as leituras não foram coincidentes, foi realizada uma terceira leitura dos resultados para aquela amostra. A intensidade de cada sinal produzido por uma determinada sonda na suspensão microbiana oriunda dos aparelhos removíveis foi comparada ao sinal produzido pela mesma sonda nas 2 linhas de controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias. A sensibilidade foi ajustada para permitir a detecção de 10^4 células das espécies que estavam sendo avaliadas pelo ajuste de concentração das sondas de DNA.

A fim de facilitar a anotação dos resultados em fichas elaboradas especificamente para esse fim, foram empregados os seguintes escores:

- Escore 0: registrado quando não houve detecção de sinal de quimioluminescência.
- Escore 1: quando observou-se um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células.
- Escore 2: sinal equivalente a 10^5 células.
- Escore 3: sinal entre 10^5 e 10^6 células.
- Escore 4: sinal equivalente a 10^6 células.
- Escore 5: sinal equivalente a mais de 10^6 células.

A análise estatística foi efetuada convertendo-se os escores em valores numéricos originais (Tabela 2). Esses registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies microbianas investigadas nas diferentes amostras.

Tabela 2 - Conversão dos escores em valores numéricos originais, para cada microrganismo avaliado nas suspensões microbianas oriundas dos aparelhos ortodônticos removíveis, *in vivo*, pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

Escore	Nível de detecção do microrganismo	Número de microrganismos
0	Não detectado	0
1	Menos de 10^5 células	10.000 (1×10^4)
2	Aproximadamente 10^5 células	100.000 (1×10^5)
3	Entre 10^5 e 10^6 células	500.000 (5×10^5)
4	Aproximadamente 10^6 células	1.000.000 (1×10^6)
5	Mais de 10^6 células	10.000.000 (1×10^7)

3.7 Análise Estatística

A fim de verificar se a aleatorização dos indivíduos nos grupos Controle e Experimental foi adequada, foram empregados os testes de Fisher para comparação da proporção dos gêneros e teste t para comparação das médias das idades.

Por se tratar de um delineamento duplo-cego cruzado e placebo-controlado, foi avaliado se houve efeito *carryover* entre a primeira e segunda semanas do grupo tratamento e a primeira e segunda semanas do grupo controle, por meio do teste Wilcoxon.

A fim de avaliar o nível de contaminação dos aparelhos removíveis por cada um dos 40 microrganismos avaliados, assim como a eficácia do uso de spray com gluconato de clorexidina a 0,12%, a quantidade detectada de células das diferentes espécies bacterianas foi comparada nos aparelhos removíveis dos grupos Controle e Experimental, por meio do teste de Wilcoxon para dados pareados.

Todos os testes empregados para análise estatística foram efetuados, utilizando o software *SAS (Statistical Analysis System) for Windows* versão 9.1.3 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

O nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS



4 RESULTADOS

4.1 Da aleatorização dos indivíduos

Os 20 pacientes (100%) selecionados para o estudo participaram do mesmo até a sua conclusão.

Os resultados da análise da aleatorização dos indivíduos nos grupos Controle (primeira semana) e Experimental (segunda semana) encontram-se na Tabela 3. Com relação à idade e ao gênero não houve diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos sorteados para a primeira e segunda semana. Na primeira semana foram sorteados para o grupo controle 55,6% dos indivíduos do gênero masculino e 44,4% do gênero feminino, enquanto que no grupo Experimental 45,4% eram do gênero masculino e 54,6% do gênero feminino ($p=0,99$). Em relação à idade, na primeira semana a média foi de 9,4 comparando com 8,5 da segunda semana ($p=0,14$).

Tabela 3 - Caracterização comparativa dos indivíduos dos grupos Controle (uso de spray com solução placebo) e Experimental (uso de spray com gluconato de clorexidina a 0,12%)

	Total	1º semana	2º semana	P
Sexo				
Masculino	9	55,6%	45,4%	0,99*
Feminino	11	44,4%	54,6%	
Idade				
(média, DP)	20	9,4 (1,3)	8,5 (1,3)	0,14#

*Valor de p para teste de Fisher

valor de p para teste t

Por se tratar de um delineamento duplo-cego cruzado e placebo-controlado, verificou-se se houve efeito *carryover* entre os pares de tratamento e os pares de controle. Após análise estatística, conclui-se que o delineamento foi adequado, pois não houve diferença significativa entre as duas semanas do grupo experimental e nem entre as duas semanas do grupo controle ($p > 0,05$) (Apêndice A e B).

4.2 Da ocorrência de 40 espécies de microrganismos nos aparelhos ortodônticos removíveis

De acordo com os resultados obtidos observou-se que todos os aparelhos ortodônticos removíveis do grupo Controle (spray de solução placebo) encontravam-se contaminados por pelo menos um dos microrganismos avaliados, sendo que *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. gordonii* e *E. corrodens*, ocorreram em 100% dos aparelhos.

A espécie menos prevalente foi *T.denticola*, tendo sido encontrada em 55% dos aparelhos. A porcentagem de ocorrência de cada um dos 40 microrganismos avaliados está apresentada na Figura 7.

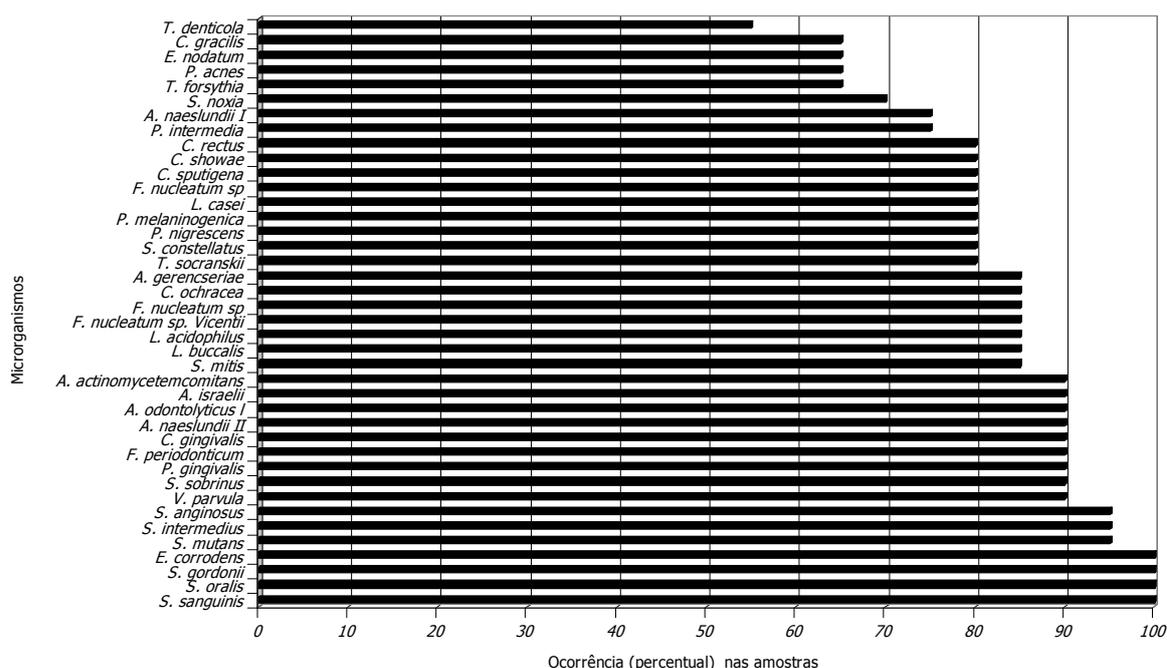


Figura 7 - Porcentagem de ocorrência dos 40 microrganismos avaliados, em aparelhos ortodônticos removíveis do grupo Controle, por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

A figura 8 apresenta a ocorrência dos microrganismos presentes nos aparelhos ortodônticos removíveis do grupo controle, agrupadas por complexos microbianos, grupo dos *Actinomyces* e bactérias cariogênicas.

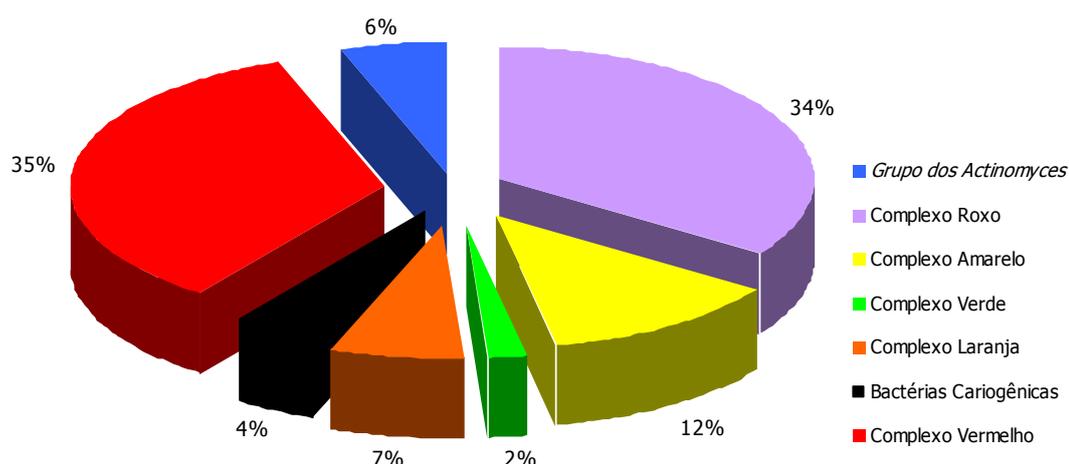


Figura 8 - Prevalência das bactérias presentes nos aparelhos ortodônticos removíveis do grupo Controle, agrupadas por complexos microbianos, grupo dos *Actinomyces* e bactérias cariogênicas.

Avaliando as bactérias por complexos, pôde-se observar que as bactérias periodontopatogênicas pertencentes ao complexo vermelho foram evidenciadas em maiores quantidades do que as pertencentes ao complexo laranja. Dentre os demais complexos de microrganismos não associados com patologias específicas, o complexo roxo apresentou-se em maiores quantidades, estando presente em 34% das amostras.

Com relação à análise semi-quantitativa, o número total das 40 espécies de microrganismos variou de 410.000 a 69.210.000, com mediana de 21.800.000.

A distribuição da quantidade de cada microrganismo avaliado no grupo Controle encontra-se na tabela 4.

Tabela 4 - Quantificação dos microrganismos presentes nos aparelhos ortodônticos removíveis do Grupo Controle (spray de solução placebo)

Microrganismo	M(Q1-Q3)	Microrganismo	M(Q1-Q3)
Bactérias cariogênicas		Complexo verde	
<i>L. acidophilus</i>	10.000 (10.000-55.000)	<i>C. gingivalis</i>	500.000 (55.000-1.000.000)
<i>L. casei</i>	10.000 (10.000-55.000)	<i>C. sputigena</i>	100.000 (10.000-500.000)
<i>S. mutans</i>	500.000 (55.000-1.000.000)	<i>E. corrodens</i>	500.000 (100.000-1.000.000)
<i>S. sobrinus</i>	500.000 (100.000-1.000.000)	Complexo laranja	
Grupo dos Actinomyces		<i>C. gracilis</i>	10.000 (0- 500.000)
<i>A. gerencseriae</i>	100.000 (10.000-300.000)	<i>C. rectus</i>	10.000 (10.000-500.000)
<i>A. israelii</i>	55.000 (10.000-100.000)	<i>C. showae</i>	55.000 (10.000-500.000)
<i>A. naeslundii I</i>	100.000 (10.000-100.000)	<i>C. ochracea</i>	100.000 (10000-500000)
<i>A. naeslundii II</i>	500.000 (500.000-1.000.000)	<i>F. nucleatum sp nucleatum</i>	300.000 (55.000-1.000.000)
<i>A. odontolyticus I</i>	300.000 (55.000 - 500.000)	<i>F. nucleatum sp vincentii</i>	300.000 (55.000-1.000.000)
Complexo roxo		<i>F. nucleatum sp polymorphum</i>	100.000 (10.000-500.000)
<i>V. parvula</i>	1.000.000 (500000-1000000)	<i>F. periodonticum</i>	1.000.000 (100000-5500000)
Complexo amarelo		<i>P. intermedia</i>	10.000 (5000-100000)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	100.000 (10.000-500.000)	<i>P. melaninogenica</i>	500.000 (55.000 -1.000.000)
<i>L. buccalis</i>	100.000 (10.000-500.000)	<i>P. nigrescens</i>	100.000 (10.000-500.000)
<i>P. acnes</i>	10.000 (0-55.000)	<i>S. noxia</i>	100.000 (0- 500.000)
<i>S. anginosus</i>	500.000 (55.000-500.000)	Complexo vermelho	
<i>S. constellatus</i>	300.000 (55.000-500.000)	<i>E. nodatum</i>	10.000 (0 - 55.000)
<i>S. gordonii</i>	1.000.000 (500000-1000000)	<i>P. gingivalis</i>	100.000 (10.000 -500.000)
<i>S. intermedius</i>	300.000 (55.000-500.000)	<i>T. forsythia</i>	10.000 (0 - 300.000)
<i>S. mitis</i>	750.000 (500.000 -1.000.000)	<i>T. denticola</i>	10.000 (0 -300.000)
<i>S. oralis</i>	500.000 (300.000-1.000.000)	<i>T. socranskii</i>	100.000 (10.000 -1.000.000)
<i>S. sanguinis</i>	1.000.000 (500.000-1.000.000)		

Os valores referentes ao número total de microrganismos encontram-se expressos como M(Q1-Q3), onde M= mediana, Q1= primeiro quartil e Q3= terceiro quartil.

Os microrganismos encontrados em maiores quantidades, dentre todas as sondas avaliadas foram *V. parvula*, *F. periodonticum*, *S. gordonii* e *S. sanguinis*.

Com relação às sondas para microrganismos cariogênicos, *S. mutans* e *S. sobrinus* foram encontrados em quantidades maiores que *L. acidophilus* e *L. casei*, enquanto que *A. naeslundii II* foi a espécie observada em maior quantidade no grupo dos *Actinomyces*.

Dentre os microrganismos pertencentes ao complexo amarelo, as espécies presentes em maiores quantidades foram *S. gordonii*, *S. sanguinis* e *S. mitis*. Com relação às três espécies bacterianas pertencentes ao complexo verde, *C. gingivalis* e *E. corrodens* foram encontradas em maiores quantidades, seguidas de *C. sputigena*.

A espécie do complexo laranja encontrada em maior quantidade nos aparelhos ortodônticos removíveis avaliados foi *F. periodonticum*. Com relação ao complexo vermelho, o microrganismo que apresentou maior ocorrência foi *P. gingivalis* e *T. socranskii*.

4.3 Da eficácia da clorexidina sobre microrganismos cariogênicos

Após o uso do spray de gluconato de clorexidina a 0,12% nos aparelhos ortodônticos removíveis (Grupo Experimental), observou-se uma diminuição estatisticamente significativa dos seguintes microrganismos cariogênicos: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus acidophilus* ($p < 0,05$). No entanto, para os *Lactobacillus casei*, não houve redução significativa ($p = 0,3711$). Os resultados das comparações entre os Grupos Controle (uso de spray com solução placebo) e Experimental (uso de spray com gluconato de clorexidina a 0,12%) pode ser evidenciada na Tabela 5 e Figura 9.

Tabela 5 - Resultados das comparações entre os grupos Controle (uso de spray com solução placebo) e Experimental (uso de spray com gluconato de clorexidina a 0,12%), com relação aos diferentes microrganismos cariogênicos avaliados

Microrganismo	Grupo Controle	Grupo Experimental	p*
	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	
<i>S. mutans</i>	500.000 (55.000-1.000.000)	10.000 (5000-100.000)	0,0001
<i>S. sobrinus</i>	500.000 (100.000-1.000.000)	100.000 (5000-300.000)	0,0005
<i>L. casei</i>	10.000 (10.000-55.000)	10.000 (5000-10000)	0,3711
<i>L. acidophilus</i>	10.000 (10.000-55.000)	10.000 (0-10.000)	0,0244
Total de microrganismos cariogênicos	1.020.000 (0-3.000.000)	130.000 (0-2.200.000)	0,0002

* valor de p para o teste de Wilcoxon pareado

Os valores encontram-se expressos como M(Q1-Q3), onde M= mediana, Q1= primeiro quartil e Q3= terceiro quartil.

Com relação à análise semi-quantitativa, o número total de microrganismos das 4 espécies de microrganismos cariogênicos nos indivíduos do grupo Experimental variou de 0 a 2.200.000, com mediana de 130.000.

Quando comparado ao grupo Controle, observou-se que o número total de microrganismos no grupo Experimental foi menor. A mediana do total de microrganismos foi de 1.020.000 no grupo Controle e de 130.000 no grupo Experimental, sendo essa diferença significativa ($p=0,0002$), evidenciando a eficácia do spray de solução à base de clorexidina.

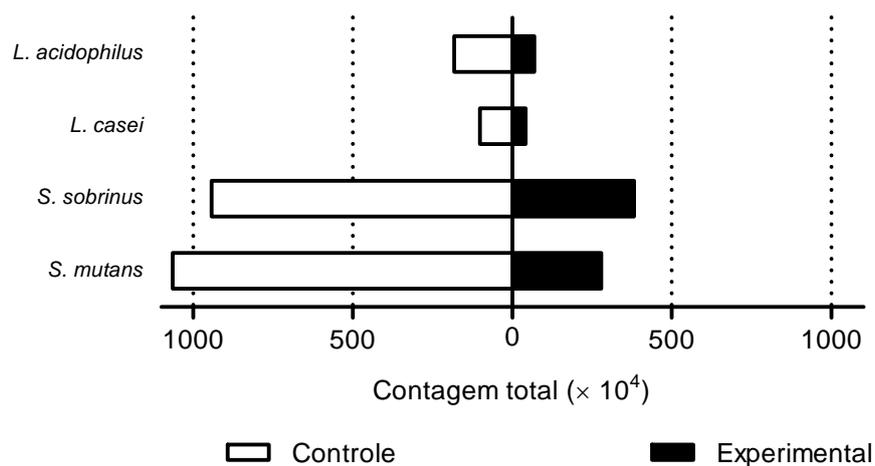


Figura 9 - Comparação do número total de microrganismos entre os grupos Controle (spray com solução placebo) e Experimental (spray com solução de gluconato de clorexidina a 0,12%) para os microrganismos cariogênicos.

4.4 Da eficácia da clorexidina sobre microrganismos periodontopatogênicos dos complexos laranja e vermelho

Após o uso de spray com gluconato de clorexidina a 0,12% nos aparelhos ortodônticos removíveis, observou-se uma diminuição numérica de todos os microrganismos periodontopatogênicos dos complexos laranja e vermelho avaliados. Essa redução (grupo Experimental) foi estatisticamente significativa quando os dois grupos foram comparados ($p < 0,05$), com exceção apenas do *T. socranskii*, o qual não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 10 e Tabela 6).

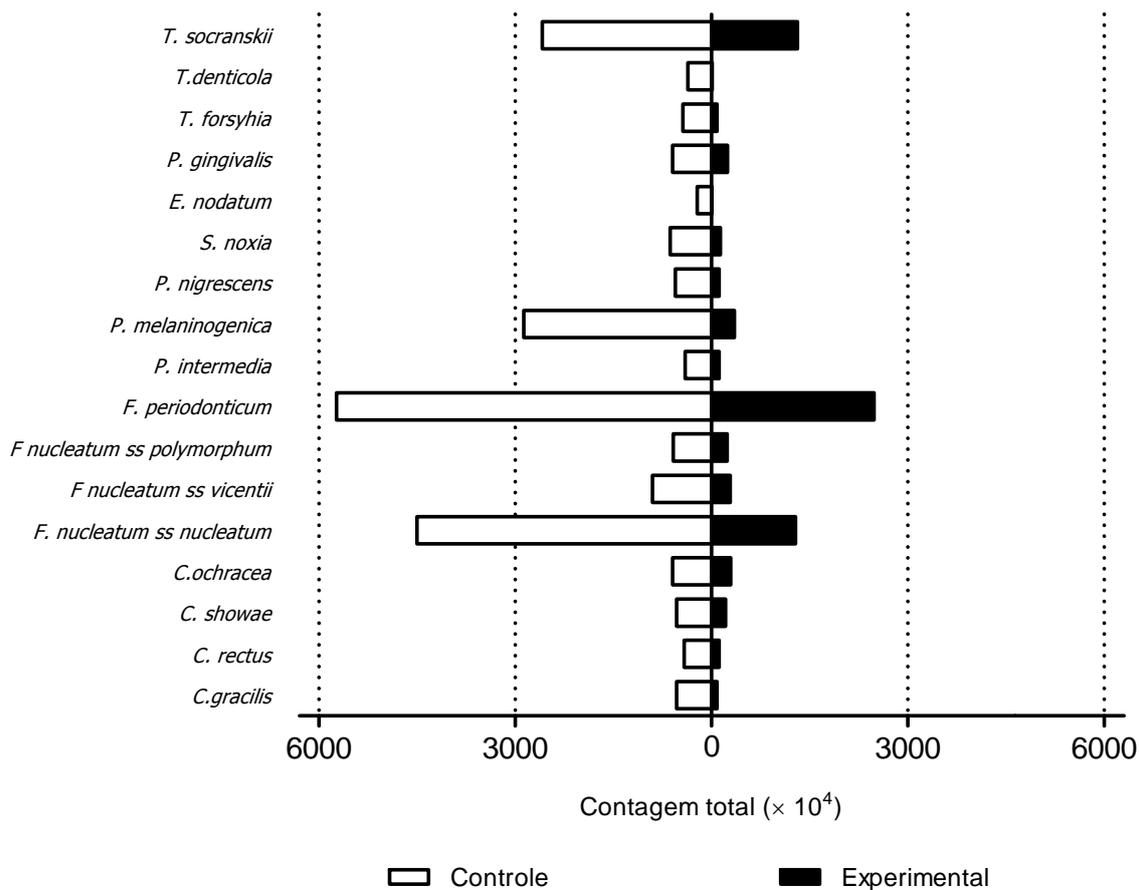


Figura 10 - Comparação do número total de microrganismos entre os grupos Controle (spray com solução placebo) e Experimental (spray com solução de gluconato de clorexidina a 0,12%) para os microrganismos periodontopatogênicos.

Tabela 6 - Resultados das comparações entre os grupos Controle (uso de spray com solução placebo) e Experimental (uso de spray com gluconato de clorexidina a 0,12%), com relação aos diferentes microrganismos periodontopatogênicos dos complexos laranja e vermelho avaliados

Microrganismo	Grupo Controle	Grupo Experimental	p*
	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	
Complexo laranja			
<i>C. gracilis</i>	10.000 (0-500.000)	0 (0-10.000)	0,0010
<i>C. rectus</i>	10.000 (10.000-500.000)	5000 (0-10.000)	0,0098
<i>C. showae</i>	55.000 (10.000-500.000)	5000 (0-10.000)	0,0071
<i>C. ochracea</i>	100.000 (1.0000-500.000)	10.000 (0-100.000)	0,0161
<i>F. nucleatum ss nucleatum</i>	300.000 (55.000-1.000.000)	100.000 (5000-100.000)	0,0015
<i>F. nucleatum ss vincentii</i>	300.000 (55.000-1.000.000)	10.000 (0-100.000)	<0,0001
<i>F. nucleatum ss polymorphum</i>	100.000 (10.000-500.000)	10.000 (0-100.000)	0,0198
<i>F. periodonticum</i>	1.000.000 (100.000-5.500.000)	100.000 (0-500.000)	0,0005
<i>P. intermedia</i>	10.000 (5000-100.000)	0 (0-10.000)	0,0073
<i>P. melaninogenica</i>	500.000 (55.000-1.000.000)	100.000 (0-100.000)	0,0034
<i>P. nigrescens</i>	100.000 (10.000-500.000)	10.000 (0-100.000)	0,0001
<i>S. noxia</i>	100.000 (0-500.000)	10.000 (0-55.000)	0,0002
Complexo vermelho			
<i>E. nodatum</i>	10.000 (0-55.000)	0 (0-10.000)	0,0020
<i>P. gingivalis</i>	100.000 (10.000-500.000)	5000 (0-100.000)	0,0045
<i>T. forsythia</i>	10.000 (0-300.000)	0 (0-10.000)	0,0137
<i>T. denticola</i>	10.000 (0-300.000)	0 (0-10.000)	0,0078
<i>T. socranskii</i>	100.000 (10.000-1.000.000)	55.000 (0-100.000)	0,0903

* valor de *p* para o teste de Wilcoxon pareado

Os valores encontram-se expressos como M(Q1-Q3), onde M= mediana, Q1= primeiro quartil e Q3= terceiro quartil.

Com relação à análise semi-quantitativa, o número total de microrganismos das 17 espécies periodontopatogênicas dos complexos vermelho e laranja nos indivíduos do grupo Experimental variou de 0 a 34.420.000 com mediana de 1.045.000

Quando comparado ao grupo Controle, observou-se que o número total de microrganismos no grupo Experimental foi menor. A mediana do total de microrganismos foi de 3.005.000 no grupo Controle e de 1.045.000 no grupo Experimental, sendo essa diferença significativa ($p=0,0024$), evidenciando a eficácia dos bochechos com solução à base de clorexidina (Tabela 7).

Quando os microrganismos foram avaliados por complexos, foi observada diferença significativa em ambos os complexos (laranja e vermelho), com contagens menores de bactérias após o uso do spray de solução de gluconato de clorexidina a 0,12% ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados das comparações entre os grupos Controle (uso do spray de solução placebo) e Experimental (uso do spray de gluconato de clorexidina a 0,12%), com relação ao total de microrganismos detectados e à detecção de microrganismos dos complexos laranja e vermelho

Microrganismos	Grupo Controle	Grupo Experimental	p^*
	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	
Total de microrganismos (Complexos laranja + vermelho)	3.005.000 (0-43.500.000)	1.045.000 (0-34.420.000)	0,0024
Complexo laranja	2185000 (0-39000000)	400000 (0-23800000)	0,0004
Complexo vermelho	65000 (0-11600000)	120000 (0-10620000)	0,0342

*: valor de p para o teste de Wilcoxon.

Os valores encontram-se expressos como M(Q1-Q3), onde M= mediana, Q1= primeiro quartil e Q3= terceiro quartil

5 DISCUSSÃO



5 DISCUSSÃO

5.1 Da metodologia

O presente estudo clínico foi duplo-cego cruzado, placebo-controlado e randomizado. A principal vantagem desse delineamento é eliminar a grande variação existente entre indivíduos em resposta a um tratamento, tendo em vista que todos os indivíduos são submetidos a todos os tratamentos (Tenuta, 2003). Este tipo de amostragem tem como objetivo minimizar a incorporação de vieses, os quais poderiam agir como fatores de confusão, interferindo nos resultados obtidos. Optou-se pela realização de um estudo clínico randomizado, pois esse representa o “padrão ouro” (delineamento ideal) das pesquisas que avaliam a eficácia clínica de materiais e técnicas de tratamento (Fletcher et al., 2002). Todos os elementos da população têm igual probabilidade de pertencer à amostra, e todas as possíveis amostras têm também igual probabilidade de ocorrer (Costa Neto, 2002).

Um dos principais problemas do delineamento cruzado é o efeito *carryover*, observado quando o efeito da primeira semana do grupo experimental interfere nos resultados da segunda semana do grupo experimental o mesmo podendo ocorrer com o grupo controle. No presente estudo, para evitar este possível efeito residual, incluímos um período de *wash-out* de 15 dias e após análise estatística, evidenciou-se que o delienamento foi adequado, tendo em vista que não houve efeito *carryover* ($p > 0,05$).

Outro aspecto importante para a confiabilidade dos resultados é que de acordo com a análise estatística da aleatorização dos indivíduos que participaram dos grupos Controle e Experimental, observou-se que não houve diferença entre os 2 grupos com relação ao gênero e à idade ($p > 0,05$), evidenciando que a aleatorização foi adequada.

A fim de minimizar ainda mais os possíveis fatores de confusão que pudessem interferir nos resultados, após a instalação dos aparelhos ortodônticos removíveis, o material para higiene (escova e dentifrício padronizados) e desinfecção (frascos plásticos com solução placebo ou experimental) foi entregue aos indivíduos participantes do estudo, que receberam as orientações com relação à maneira e

freqüência da escovação e de uso do spray, de acordo com cada grupo, efetuada por um mesmo profissional cirurgião-dentista. Salienta-se que os indivíduos não tinham conhecimento de qual solução (placebo ou com clorexidina) estavam utilizando para os bochechos.

Apesar desses cuidados acreditamos que, assim como em qualquer pesquisa clínica, alguns fatores inerentes à colaboração e dedicação por parte dos indivíduos que participaram do estudo possam ter apresentado alguma influência nos resultados. Como relatado por Featherstone (2006), a eficácia do uso domiciliar da clorexidina pode ter seu potencial subestimado, tendo em vista a necessidade da colaboração do paciente, para obter o resultado esperado.

A técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, amplamente utilizada em Odontologia (Ruvière et al., 2007; Youravong et al., 2007; Filoche et al., 2008; Teles et al., 2008; Matarazzo et al., 2008; Vianna et al., 2008; Siqueira e Rôças, 2009; Máximo et al., 2009; Nascimento et al., 2009; Gizani et al., 2009; Papaioannou et al., 2009; Ioannou et al., 2009; Adriaens et al., 2009), foi empregada nesse estudo como método para a detecção de microrganismos em aparelhos ortodônticos removíveis *in vivo*. A técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, preconizada por Sockransky et al. em 1994, é um método de diagnóstico que oferece vantagens em relação aos métodos tradicionais de cultura microbiana, incluindo a detecção de microrganismos de desenvolvimento lento, nutricionalmente exigentes, além da detecção da microbiota não cultivável. Também é um método preciso e mais rápido que o empregado na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Siqueira et al., 2000; Moraes et al., 2002).

Outras vantagens da técnica incluem: permitir a avaliação de várias espécies bacterianas em um grande número de amostras de uma única vez; permitir a detecção de microrganismos menos comuns, não identificáveis por técnicas de cultura microbiana e apresentar alta especificidade (92%); e permitir a detecção sem a necessidade de amplificação. Entretanto, apresenta algumas limitações como a sensibilidade, não sendo uma técnica tão sensível quanto o PCR por permitir a detecção de um número a partir de 10^4 células, sendo por isso um método semi-quantitativo, além de detectar apenas espécies cujas sondas foram previamente selecionadas (Socransky et al., 1998; Socransky et al., 2004).

As espécies bacterianas selecionadas para este estudo foram espécies encontradas com frequência na cavidade bucal, associadas ou não com patologias específicas, as quais podem ocorrer durante o tratamento ortodôntico, incluindo a cárie dental e a doença periodontal.

As 17 sondas de DNA de microrganismos periodontopatogênicos dos complexos vermelho e laranja utilizadas nesse estudo foram selecionadas por estarem altamente relacionadas com a presença de inflamação gengival e doença periodontal crônica (Socransky et al., 1998; Socransky e Haffajee, 2005; Haffajee et al., 2008).

As 4 sondas de DNA de microrganismos cariogênicos utilizadas nesse estudo (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. casei* e *L. acidophilus*) foram selecionadas devido ao seu importante papel na etiologia e desenvolvimento da cárie dental (Ajdic et al., 2002; Berkowitz, 2003; McNeill e Hamilton, 2003; Fejerskov e Kidd, 2005; Badet e Thebaud, 2008; Saito et al., 2009).

No presente estudo, os pacientes receberam aparelhos ortodônticos removíveis, compostos de placa de acrílico e grampos com ancoragem nos primeiros molares permanentes superiores. Bagatin-Rossi, em 2007, avaliou a contaminação das partes poliméricas (placa de acrílico) e metálicas (fios e bandas) dos disjuntores de Haas evidenciando que esses aparelhos se tornaram intensamente contaminados por estreptococos do grupo mutans, com exuberante desenvolvimento de biofilme no acrílico, nas bandas e nas demais áreas dos aparelhos (fios e parafuso).

No presente estudo o material utilizado para confecção da base acrílica dos aparelhos ortodônticos removíveis foi o polimetilmetacrilato (PMMA), sob a forma de esferas de pó e monômero líquido (metilmetacrilato) (Jagger et al., 1999). A maneira como geralmente esses componentes são misturados pode levar a uma falta de uniformidade na conversão da matriz resinosa, com presença de monômero residual. Como resultado, pode haver descoloração da resina, possibilidade de reações alérgicas (Eliades e Brantley, 2000) e maior sorção de água (Dogan et al., 1995), com interferência nas propriedades mecânicas dos polímeros. Assim, falhas nessa mistura podem favorecer o aparecimento de porosidades que, quando presentes na superfície do aparelho, dificultam ou impossibilitam sua limpeza diária adequada, permitindo a retenção de resíduos e o desenvolvimento de microrganismos, os quais podem penetrar e se manter viáveis a uma profundidade

que varia de 1 a 2 micrometros (Davenport, 1972), comportando se como uma esponja (Martins-Ortiz et al., 2004). Segundo Arendorf e Addy (1985) e Jorge et al. (1987), o acrílico do aparelho, mesmo quando adequadamente polido, atua como uma superfície rígida não-descamativa, propícia à formação de biofilme, o que pode ser considerado um fator adicional para aquisição de estomatites, como infecções fúngicas na mucosa bucal. A maneira de confeccionar os aparelhos ortodônticos removíveis empregada nesse trabalho foi padronizada, como descrito nos estudos de Sreenivasan et al. (2004) e Auschill et al. (2005) e realizada por um único profissional. Com o objetivo de reduzir as irregularidades e porosidades da resina acrílica, realizamos o polimento químico, a fim de tornar a superfície do aparelho menos susceptível à retenção/adesão de microrganismos.

No presente estudo, empregamos a forma de spray para a desinfecção dos aparelhos, como preconizado por Lessa et al. (2007). Os métodos de desinfecção de aparelhos acrílicos devem ser capazes de promover a inativação rápida dos microrganismos patogênicos, sem causar efeitos adversos à estrutura do aparelho (Pavarina et al., 2003). A desinfecção por imersão em soluções químicas pode comprometer a estrutura da resina acrílica, devido à sua propriedade de absorção de moléculas de água. Por essa razão realizamos a desinfecção com frasco de spray, contendo a solução de clorexidina, a qual foi borrifada no aparelho, a fim de evitar distorções que provavelmente ocorreriam por imersão.

A substância ideal para desinfecção de aparelhos ortodônticos deveria ser bactericida e apresentar um amplo espectro de ação, ser atóxica, não carcinogênica e não irritante. Além disso, deveria ser de fácil uso, eficaz na remoção do biofilme sem provocar danos ao aparelho, quimicamente estável, não deveria conter álcool e deveria apresentar baixo custo (Kolstad e Petit, 1983). Tendo em vista que não há um agente antimicrobiano que reúna todos os requisitos da substância ideal, concordamos com Moshrefi (2002) quando relatou que a clorexidina ainda é considerada o antimicrobiano "padrão ouro", quando comparada aos demais agentes utilizados para controle do biofilme dental. Assim, no presente estudo foi utilizado o Periogard[®] no grupo Experimental, sob a forma de spray, que é uma solução à base de gluconato de clorexidina a 0,12%, disponível no comércio e amplamente utilizada na prática odontológica, com finalidades diversas (Denton, 1991).

O protocolo de uso da solução placebo ou à base de clorexidina (2 vezes por semana) foi baseado nos estudos de Peixoto et al. (2009) e de Bagatin-Rossi (2007) que observaram, por meio de cultura microbiana e microscopia eletrônica de varredura, a eficácia desse protocolo sobre estreptococos do grupo mutans, em aparelhos removíveis de acrílico e em disjuntores de Haas, respectivamente.

5.2 Dos resultados

Da ocorrência das 40 espécies de microrganismos nos aparelhos ortodônticos removíveis

A cavidade bucal apresenta inúmeras espécies de microrganismos presentes na saliva ou colonizando suas diferentes superfícies, sob a forma de biofilme (Fejerskov e Kidd, 2005). No presente estudo detectamos a ocorrência da maioria das 40 sondas pesquisadas, sendo que *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. gordonii* e *E. corrodens* ocorreram em 100% dos indivíduos.

Como já salientado, vários estudos têm evidenciado um aumento nos níveis de microrganismos cariogênicos na cavidade bucal, após a instalação de aparelhos ortodônticos fixos e removíveis (Mattingly et al., 1983; Batoni et al., 2001; Anhoury et al., 2002; Jordan e Leblanc, 2002; Leung et al., 2006; Sari e Birinci, 2007; Lessa et al., 2007; Magno et al., 2008; Peixoto et al., 2009). No presente estudo, as 4 sondas cariogênicas empregadas (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. casei* e *L. acidophilus*) foram detectadas na maioria das amostras dos aparelhos ortodônticos removíveis do grupo Controle, evidenciando que essas espécies são componentes importantes da microbiota de indivíduos com aparelhos ortodônticos removíveis.

Em humanos, os *S. mutans* são mais frequentemente isolados que os *S. sobrinus* (Loesche, 1986). No presente estudo observamos que os *S. sobrinus*, assim como os *S. mutans*, estavam presentes na maioria dos aparelhos ortodônticos removíveis (90% e 95% respectivamente) do grupo Controle, em maior quantidade que o *L. acidophilus* e *L. casei*. Sabe-se que os *S. sobrinus* são microrganismos altamente agressivos, uma vez que são mais acidogênicos que os *S. mutans* (De Soet et al., 1990), dominando o biofilme dentário em indivíduos que fazem uso

irrestrito de sacarose. Por esse motivo, indivíduos que apresentam altas contagens de *S. sobrinus* na saliva ou no biofilme dental apresentam maior risco de cárie que indivíduos que apresentam apenas a espécie *S. mutans* (Kohler et al., 1988; Fujiwara et al., 1991; Hofling et al., 1999; Lindquist e Emilson, 2004).

A coexistência de *S. sobrinus* e *S. mutans* parece ser um importante fator no desenvolvimento da cárie dental (Lindquist e Emilson, 1991). Quando ambas as espécies estão presentes na cavidade bucal, evidencia-se maior experiência de cárie nos indivíduos que quando se detecta apenas *S. mutans* (Kohler e Bjarnason, 1987; Seki et al., 2006). No presente estudo, os aparelhos ortodônticos removíveis do grupo Controle apresentaram-se multicolonizados, ou seja, apresentaram ambas as espécies, *S. mutans* e *S. sobrinus*. Segundo Rupf et al. (2006), a colonização por *S. sobrinus* representa um importante fator de risco adicional para a cárie dental.

Em 2001, Batoni et al. analisaram a contaminação bacteriana por *S. mutans* em aparelhos ortodônticos removíveis de crianças, concluindo que o uso destes aparelhos pode criar novas áreas retentivas, favorecendo a aderência e desenvolvimento destes microrganismos.

Assim, no presente estudo o emprego da técnica de biologia molecular para a detecção de microrganismos cariogênicos *in vivo* evidenciou que pacientes sob tratamento ortodôntico, com o uso de aparelhos ortodônticos removíveis, apresentam maior risco de cárie, também por estes se apresentarem multicolonizados por *S. mutans* e por *S. sobrinus*.

A técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi empregada em ortodontia em apenas um estudo piloto efetuado por Anhoury et al. (2002). Esses autores compararam a contagem de microrganismos em 32 bráquetes metálicos e 16 cerâmicos no total, dois de cada paciente, obtidos da região de incisivo central e pré-molar superior no momento da descolagem do aparelho ao final do tratamento, após períodos não relatados de permanência na cavidade bucal. De acordo com os resultados obtidos, o tipo de bráquete não influenciou na contagem de microrganismos cariogênicos (*Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*).

No presente estudo, os aparelhos ortodônticos removíveis encontraram-se mais densamente contaminadas por *S. mutans* e *S. sobrinus*, seguidos pelos *L. casei* e *L. acidophilus*, enquanto que no estudo de Anhoury et al.

(2002) essa contaminação foi ligeiramente maior para *L. acidophilus* que para *S. mutans*. Essa diferença pode ser possivelmente explicada pelo fato de que Anhoury et al. (2002) avaliaram bráquetes removidos no final do tratamento ortodôntico, ou seja, após longos períodos de permanência na cavidade bucal, o que pode ter aumentado a colonização posterior por lactobacilos.

Com relação aos lactobacilos, Sari e Birinci (2007), em um estudo por meio de cultura microbiana, observaram que após a instalação de aparelhos ortodônticos fixos com bráquetes os níveis de *S. mutans* foram de 460 unidades formadoras de colônia (log/ml), enquanto que os níveis de lactobacilos foram bem menores, na ordem de 34 unidades formadoras de colônia (log/ml). No presente estudo, empregando técnica de biologia molecular, também se observou que a detecção de lactobacilos foi menor, ou seja, os aparelhos ortodônticos removíveis encontravam-se mais densamente contaminados por *S. mutans* e *S. sobrinus*, seguidos pelos *L. acidophilus* e *L. casei*.

Um dos problemas clínicos mais freqüentes durante o tratamento ortodôntico é a ocorrência de alterações inflamatórias nos tecidos gengivais, incluindo a gengivite (Zachrisson e Zachrisson, 1972; Sallum et al., 2004). As alterações locais que ocorrem após a instalação de aparelhos ortodônticos fixos elevam a prevalência de microrganismos periodontopatogênicos no biofilme dental, exacerbando a gengivite em pacientes portadores de bráquetes (Sallum et al., 2004; Lee et al., 2005). Com relação aos aparelhos ortodônticos removíveis, ainda não há na literatura estudos que relacionem o uso deste aparelho com alterações periodontais.

Como anteriormente já salientado, as espécies de microrganismos periodontopatogênicos dos complexos vermelho e laranja estão altamente relacionadas com a presença de inflamação gengival e doença periodontal crônica (Socransky et al., 1998; Socransky e Haffajee, 2005; Haffajee et al., 2008). De acordo com os resultados do presente estudo, empregando a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, verificou-se que os aparelhos ortodônticos removíveis também podem atuar como nichos para a colonização por microrganismos periodontopatogênicos dos complexos laranja e vermelho podendo favorecer, assim,

a inflamação gengival pois muitas vezes estão situados em íntima proximidade com os tecidos moles da cavidade bucal, incluindo palato e tecidos gengivais.

Empregando outras técnicas de biologia molecular, como o PCR, alguns estudos também têm relatado a presença de patógenos periodontais no biofilme supra e subgengival, durante o tratamento ortodôntico (Sallum et al., 2004; Lee et al., 2005; Thornberg et al., 2009). No presente estudo, observamos que os aparelhos ortodônticos removíveis se encontravam contaminados por microrganismos periodontopatogênicos dos complexos laranja e vermelho com maior prevalência para os microrganismos do complexo vermelho (35%). Assim, verifica-se que esses periodontopatógenos também podem ser considerados componentes importantes da microbiota de indivíduos com aparelhos ortodônticos removíveis.

As espécies dos complexos amarelo, verde, roxo e o grupo dos *Actinomyces* são microrganismos que não estão relacionados com doenças específicas e geralmente colonizam o biofilme dental previamente às espécies dos complexos laranja e vermelho. De acordo com os resultados do estudo de Anhoury et al. (2002), o grupo dos *Actinomyces* foi encontrado em maiores quantidades em bráquetes que as bactérias dos complexos amarelo, verde e roxo. No presente estudo efetuado com aparelhos ortodônticos removíveis, o complexo roxo foi encontrada em maior quantidade quando comparada aos microrganismos dos complexos amarelo, verde e grupo dos *Actinomyces*.

Pelo exposto, verificou-se que os aparelhos ortodônticos removíveis encontravam-se multicolonizados por diferentes espécies de microrganismos. Conforme salientado por Martins-Ortiz et al. (2004), no consultório odontológico não são tratados apenas pacientes sistemicamente saudáveis, mas também cardiopatas, diabéticos e imunodeprimidos, entre outros, justificando a necessidade de cuidados adicionais. Assim, em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos removíveis, o controle da contaminação microbiana por meio do uso de agentes químicos é fundamental, não apenas para reduzir o risco de doenças prevalentes como cárie dental e doença periodontal, mas também para preservar a saúde geral do paciente e reduzir o risco de bacteremias.

Da eficácia da clorexidina sobre os microrganismos cariogênicos e periodontopatogênicos

Em Ortodontia, observa-se que a clorexidina vem sendo empregada para redução dos níveis de microrganismos cariogênicos, sob a forma de bochecho (Amitha e Munshi, 1995; Gehlen et al., 2000; Auschill et al., 2005; Maruo et al. 2008) ou spray (Lessa et al., 2007; Peixoto et al., 2009). Os resultados desses estudos, realizados com o emprego da técnica de cultura microbiana, evidenciaram a eficácia desse agente antimicrobiano, em diferentes protocolos de aplicação. Entretanto, a eficácia deste agente antimicrobiano sobre os microrganismos cariogênicos e sobre patógenos periodontais, na clínica ortodôntica, ainda não tinha sido verificada por meio de técnicas moleculares.

A clorexidina é uma biguanida (Hidalgo e Dominguez, 2001), descoberta na década de 40 por pesquisadores que buscavam desenvolver agentes antimalária (Parson, 1974). Embora nunca tenha sido utilizada no tratamento da malária, este agente antimicrobiano é amplamente utilizado na área médica, para o tratamento de queimaduras e anti-sepsia da pele, mãos e braços (Hidalgo e Dominguez, 2001), entre outras utilizações. A clorexidina tem sido empregada topicamente para o controle do biofilme dental desde 1959, porém foi a partir do estudo clássico de Loe et al., em 1976, que o seu uso se popularizou na Odontologia, particularmente em função do seu amplo espectro de ação, ou seja, sua eficácia contra microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos, aeróbios, anaeróbios facultativos, leveduras e vírus (Hidalgo e Dominguez, 2001).

A atividade antimicrobiana da clorexidina origina-se de sua carga positiva em pH fisiológico, facilitando sua adesão de forma não específica à parede bacteriana, carregada negativamente. Esta interação ocasiona uma alteração no equilíbrio osmótico bacteriano, com extravasamento de potássio e fósforo e precipitação do citoplasma, com conseqüente morte da bactéria (Hidalgo e Dominguez, 2001). Adicionalmente, a adesão deste agente antimicrobiano à bactéria e às glicoproteínas salivares interfere na formação da película adquirida e na adsorção bacteriana ao dente (Rolla e Melsen, 1975).

A atividade antimicrobiana da clorexidina, *in vivo*, em parte é decorrente do seu efeito prolongado (substantividade), que é a propriedade de se

adsorver, reversivelmente, à mucosa bucal, película adquirida, proteínas salivares e hidroxiapatita (Rolla et al., 1971), sendo lentamente liberada na cavidade bucal por até 24 horas (Gjerme et al., 1974). Quando utilizada topicamente, a clorexidina é uma substância segura, com baixo potencial de toxicidade (Loe et al., 1976; Fardal e Turnbull, 1986; Thylstrup e Fejerskov, 2001), não ocasionando alterações nas bactérias nem induzindo a seleção de cepas mutantes resistentes (Sreenivasan e Gaffar, 2002).

Por outro lado, o uso prolongado da clorexidina pode ocasionar efeitos colaterais, como pigmentação marrom-amarelada da estrutura dental e restaurações, alterações na sensação gustativa (Fardal e Turnbull, 1986), sabor amargo e pigmentação do dorso da língua, entre outros (Fardal e Turnbull, 1986; Thylstrup e Fejerskov, 2001).

Em 1997, Anderson et al. compararam clinicamente o efeito de bochechos com gluconato de clorexidina a 0,12%, 2 vezes ao dia, por 1, 2 e 3 meses, em 30 adolescentes sob tratamento ortodôntico. Após 3 meses, o índice de descoloração apresentou maiores escores no grupo que empregou os bochechos com clorexidina, no entanto, sem diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle (bochechos com solução placebo). Os autores concluíram que o uso da clorexidina sob a forma de bochechos, em adição à higiene bucal mecânica, foi eficaz na redução do biofilme dental e da gengivite, em adolescentes sob tratamento ortodôntico.

No presente estudo, não foram relatados efeitos colaterais significativos após o uso do gluconato de clorexidina a 0,12% no grupo Experimental, por 7 dias. Possivelmente, isso ocorreu em função da baixa concentração e do período de tempo relativamente reduzido de uso da clorexidina. Estudos adicionais são necessários, a fim de avaliar se o uso desse protocolo, por longos períodos, não ocasionaria efeitos colaterais adicionais.

Nossos resultados são concordantes com os obtidos por Lessa et al. (2007) e Peixoto et al. (2009), que utilizaram a solução de gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard[®]) para desinfecção da base de resina acrílica de aparelhos removíveis. No trabalho de Lessa et al. (2007) a clorexidina foi borrifada no aparelho uma única vez, pelo pesquisador, enquanto que Peixoto et al. (2009) avaliaram 2

protocolos domiciliares de uso da clorexidina, borrifada nos aparelhos uma ou duas vezes por semana, pelo paciente. Em ambos os trabalhos, realizados por meio da técnica de cultura microbiana e microscopia eletrônica de varredura, a clorexidina foi eficaz na redução numérica de contagem de colônias/biofilmes de estreptococos do grupo mutans na superfície do acrílico de aparelhos removíveis, em 100% dos casos, como também ocorreu no presente estudo.

Em relação aos microrganismos periodontopatogênicos dos complexos laranja e vermelho, foi observada no presente estudo redução numérica em 100% dos casos, após o uso do spray de clorexidina. A eficácia da clorexidina utilizando a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi avaliada também na Periodontia, em um estudo realizado por De Soete et al., em 2001. Esses autores verificaram que após tratamento com raspagem e alisamento radicular associado à clorexidina, houve redução significativa para as bactérias dos complexos laranja e vermelho, o que está de acordo com os resultados do presente estudo.

O protocolo de utilização do gluconato de clorexidina a 0,12%, sob a forma de spray, 2 vezes por semana, por 7 dias, empregado no presente estudo, reduziu numericamente os níveis dos microrganismos cariogênicos e periodontopatogênicos avaliados, evidenciando sua aplicabilidade do ponto de vista clínico, em aparelhos ortodônticos removíveis.

Finalizando, a análise dos resultados obtidos no presente estudo *in vivo*, em crianças, permitiu-nos a observar uma alta ocorrência de espécies microbianas em aparelhos ortodônticos removíveis, os quais se apresentam multicolonizados, e a eficácia da clorexidina sobre microrganismos cariogênicos e periodontopatogênicos presentes no acrílico e grampos dos aparelhos. Tendo em vista que a Odontologia atual encontra-se na era da *Promoção de Saúde*, deve haver uma maior divulgação sobre a maneira adequada de higienizar e desinfetar esses aparelhos após sua utilização, colaborando com a manutenção da saúde bucal dos pacientes. Tendo em vista que a literatura relativa ao estudo da contaminação bacteriana de aparelhos ortodônticos removíveis, propondo métodos para sua desinfecção, é escassa, estudos clínicos longitudinais adicionais são necessários, a fim de determinar um protocolo de desinfecção padronizado para aparelhos ortodônticos removíveis.

6 CONCLUSÃO



6 CONCLUSÃO

Considerando as condições específicas deste trabalho, com base nos resultados obtidos no estudo clínico duplo-cego cruzado e placebo-controlado randomizado em crianças, com o uso da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, pôde-se concluir que:

- Os aparelhos ortodônticos removíveis encontraram-se densamente contaminados por diferentes espécies bacterianas.

- O uso do spray com solução de gluconato de clorexidina a 0,12% ocasionou redução estatisticamente significativa nos níveis de microrganismos cariogênicos (*S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. acidophilus*).

- O uso do spray com solução de gluconato de clorexidina a 0,12% ocasionou redução numérica nas 17 espécies de microrganismos periodontopatogênicos dos complexos laranja e vermelho avaliados. Essa redução não foi estatisticamente significativa apenas para o *T. socranskii*.

- O spray com solução de gluconato de clorexidina a 0,12%, empregado duas vezes por semana pode ser útil, na prática clínica, com a finalidade de reduzir os níveis de microrganismos cariogênicos e periodontopatogênicos, em aparelhos ortodônticos removíveis, compostos de grampos e acrílico.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS*

1. Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Qian Y, Li S, Zhu H, Najar F, Lai H, White J, Roe BA, Ferretti JJ. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99(22):14434-9.
2. Adriaens LM, Alessandri R, Spörri S, Lang NP, Persson GR. Does pregnancy have an impact on the subgingival microbiota? *J Periodontol.* 2009 Jan;80(1):72-81.
3. Ahn SJ, Lim BS, Lee SJ. Prevalence of cariogenic streptococci on incisor brackets detected by polymerase chain reaction. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007; 131:736-41.
4. Alves PV, Alviano WS, Bolognese AM, Nojima LI. Treatment protocol to control *Streptococcus mutans* level in an orthodontic patient with high caries risk. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008 Jan;133(1):91-4.
5. Amitha H, Munshi AK. Effect of chlorhexidine gluconato mouthwash on the plaque microflora in children using intra oral appliances. *J Clin Pediatr Dent.* 1995; 20:23-9.
6. Anderson GB, Bowden J, Morrison EC, Caffesse RG. Clinical effects of chlorhexidine mouthwashes on patients undergoing orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1997 Jun;111(6):606-12.
7. Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle Orthodontist* 2002; 72(4): 338-43.

* De acordo com as Normas Internas do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da FORP/USP (2003).

8. Arendorf T, Addy M. Candidal carriage and plaque distribution before, during and after removable orthodontic appliance therapy. *J Clin Periodontol*. 1985 May;12(5):360-8.
9. Artun J, Brobakken BO. Prevalence of carious white spots after orthodontic treatment with multibonded appliances. *Eur J Orthod*. 1986;8(4):229-34.
10. Auschill TM, Hein M, Hellwig E, Follo M, Scullean A, Arweiler NB. Effect of two antimicrobials agents on early *in situ* biofilms formation. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 147-52.
11. Badet MC, Richard B, Dorignac G. An *in vitro* study of the pH-lowering potential of salivary lactobacilli associated with dental caries. *J Appl Microbiol*. 2001 Jun;90(6):1015-8.
12. Badet C, Thebaud NB. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J*. 2008;2:38-48.
13. Bagatin-Rossi CR. Formação de biofilme e corrosão em aparelhos disjuntores de Haas, com e sem utilização de agente antimicrobiano: estudo *in situ*. [dissertação]. Ribeirão Preto: FORP – Univ. de São Paulo; 2007.
14. Batoni G, Pardini M, Giannotti A, Ota F, Giuca MR, Gabriele M, Campa M, Senesi S. Effect of removable orthodontic appliances on oral colonization by mutans streptococci in children. *Eur J Sci* 2001;109:388-92.
15. Berkowitz RJ. Causes, treatment and prevention of early caries: a microbiologic perspective. *J Can Dent Assoc* 2003;69(5):304-7b.
16. Brêtas SM, Macari S, Elias AM, Ito IY, Matsumoto MAN. Effect of 0,4% stannous fluoride gel on mutans streptococci in relation to elastomeric rings and steel ligatures in ortjodontic patients. *J Orthod Dentofacial Orthop*. 2005; 127:428-33.

17. Brightman LJ, Terezhalmay GT, Greenwell H, Jacobs M, Endlow DH. The effects of a 0.12 per cent chlorhexidine gluconate mouthrinse on orthodontic patients aged 11 through 17 with established gingivitis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991; 100: 324-329.
18. Brook I, Gober AE. Persistence of group A beta-hemolytic streptococci in toothbrushes and removable orthodontic appliances following treatment of pharyngotonsillitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998; 124: 993-995.
19. Brusca M, Chara O, Sterin-Borda L, Rosa A. Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganism *in vitro*. *Angle Orthodontis* 2007; 77: 331-336.
20. Botha SJ Oral lactobacilli isolated from teenage orthodontic patients. *J Dent Assoc S Afr.* 1993 Apr;48(4):177-81.
21. Chang HS, Walsh LJ, Freer TJ. The effect of orthodontic treatment on salivary flow, pH, buffer capacity, and levels of mutans streptococci and lactobacilli. *Aust Orthod* 1999;15(4):229-34.
22. Consolaro A, Consolaro MFM-O. *Controvérsias na Ortodontia & Atlas de Biologia da Movimentação Dentária*. Maringá: Dental Press International; 2008.
23. Costa Neto PLO. *Estatística*. 2a ed. São Paulo: Ed. Edgard Blucher; 2002.
24. Davenport JC. The denture surface. *Br Dent J.* 1972; 133:101-5.
25. De Soet JJ, Toors FA, De Graaff J. Acidogenesis by oral streptococci at different pH values. *Caries Res* 1989;23:14-17.
26. De Soet JJ, Holbrook WP, van Amerongen WE, Schipper E, Homburg CH, de Graaff J. Prevalence of *Streptococcus sobrinus* in relation to dental caries in children from Iceland and The Netherlands. *ASDC J Dent Child.* 1990 Sep-Oct;57(5):337-42.

27. De Soete M, Mongardini C, Peuwels M, Haffajee A, Socransky S, van Steenberghe D, et al. One-stage full-mouth disinfection. Long-term microbiological results analyzed by Checkerboard DNA-DNA Hybridization. *J Periodontol*. 2001;72:374-82.
28. Denton GW. Chlorhexidine. In: Block SS, editors. *Disinfection, sterilization, preservations*. 4th ed. Philadelphia: Ed. Lea & Febiger; 1991.p.274-89.
29. Derks A, Frencken J, Bronkhorst E, Kuijpers-Jagtman AM, Katsaros C. Effect of chlorhexidine varnish application on mutans streptococci counts in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2008 Mar; 133(3): 435-9.
30. Diedrich P. Microbial colonization and various cleaning procedures for orthodontic appliances. *Fortschr Kieferorthop* 1989; 50:231-9.
31. Dills SS, Olshan AM, Goldner S, Brogdon C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. *J Prosthet Dent*. 1988; 60(4): 467-70.
32. Doğan A, Bek B, Cevik NN, Usanmaz A. The effect of preparation conditions of acrylic denture base materials on the level of residual monomer, mechanical properties and water absorption. *J Dent*. 1995 Oct;23(5):313-8.
33. Eliades T, Brantley WA. The inappropriateness of conventional orthodontic bond strength assessment protocols. *Eur J Orthod*. 2000 Feb;22(1):13-23.
34. Faltermeier A, Burgüers R, Rosentritt. Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to esthetic materials. *Am J Orthop* 2008; 133: S99-103.
35. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc* 1986; 112(6): 863-9.
36. Featherstone JDB. Delivery challenges for fluoride, chlorhexidine and xylitol. *BMD Oral Health* 2006; 15;6 Suppl 1:S8.

37. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1983 Jul 1;132(1):6-13.
38. Fejerskov O, Kidd E. Cárie Dentária. A doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Ed Santos, 2005.
39. Filoche SK, Soma D, van Bekkum M, Sissons CH. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008 Oct; 54(1):27-36.
40. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. *Epidemiologia clínica: elementos essenciais.* 3a rd. Porto Alegre: Artmed; 2002.
41. Fujiwara T, Sasada E, Mima N, Ooshima T. Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2- year-old children of Japan. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991;19:151-4.
42. Gehlen I, Netuschill L, Georg T, Reich E, Berg R, Katsaros. The influence of a 0.2% chlorhexidine mouthrinse on plaque regrowth in the orthodontic patients. *J Orofac Orthop* 2000; 61: 138-148.
43. Gibbons RJ, Cohen I, Hay DI. Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. *Infect Immun* 1986; 52:555-561.
44. Gizani S, Papaioannou W, Haffajee AD, Kavadia K, Quirynen M, Papagiannoulis L. Distribution of selected cariogenic bacteria in five different intra-oral habitats in young children. *Int J Paediatr Dent.* 2009 May;19(3):193-200.
45. Gjermo P. Chlorhexidine in dental practice. *J Clin Periodontol.* 1974; 1: 143-52.

46. Gorelick L, Geiger AM, Gwinnett AJ. Incidence of white spot formation after bonding and banding. *Am J Orthod*. 1982 Feb;81(2):93-8.
47. Gurel HG, Basciftci FA, Arslan U. Transient bacteremia after removal of a bonded maxillary expansion appliance. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2009;135:190-3.
48. Gurenlian JR. Inflammation: the relationship between oral health and systemic disease. *Dent Assist*. 2009;78:8-10, 2-4, 38-40; quiz 1-3.
49. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbioal complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiology Immunology* 2008; 23:196-205.
50. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine induced cytotoxicity. *Toxicol in Vitro* 2001;15: 271-6.
51. Higashi Y, Goto C, Hidaka T, Soga J, Nakamura S, Fujii Y, et al. Oral infection-inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2009 Apr 5.
52. Höfling JF, Spolidório DMP, Pereira CV, Rosa EAR, Moreira D. Presença de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mutans* associado a *Streptococcus sobrinus* em escolares de diferentes classes sócio-econômicas e sua relação com a atividade cariogênica dessas populações. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1999;13:173-80.
53. Houston, WJB, Isaacson KG. Orthodontic treatment with removable appliances. 2nd ed. Bristol, UK: John Wright & Sons; 1980.
54. Ioannou I, Dimitriadis N, Papadimitriou K, Sakellari D, Vouros I, Konstantinidis A. Hand instrumentation versus ultrasonic debridement in the treatment of chronic periodontitis: a randomized clinical and microbiological trial. *J Clin Periodontol*. 2009 Feb;36(2):132-41.

55. Jagger DC, Harrison A The effect of chopped poly(methyl methacrylate) fibers on some properties of acrylic resin denture base material. *Int J Prosthodont*. 1999 Nov-Dec;12(6):542-6
56. Jordan C, Leblanc DJ. Influences of orthodontics appliances on oral populations of mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17:65-71
57. Jorge AOC, Almeida NQ, Unterkircher CS, Schimizu MI. Influência do uso dos aparelhos ortodônticos sobre a presença da *Candida albicans* na cavidade bucal. *Rev APCD* 1987; 41: 308-10.
58. Kohler B, Andreen I, Jonsson B. The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. *Oral Microbiol Immunol* 1988; 3:14-7.
59. Kohler B, Bjarnason S. Mutans streptococci, lactobacilli and caries prevalence in 11- and 12-year-old Icelandic children. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987, 15:332-335.
60. Kolstad R, Petti H. A safe, effective germicide-deodorizer for removable appliances. *J Clin Orthod* 1983; 17: 56-7.
61. Lee SM, Yoo SY, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, Shin HY, Kook JK. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. *J Microbiol* 2005; 43:260-5.
62. Lessa FC, Enoki C, Ito IY, Faria G, Matsumoto MA, Nelson-Filho P. *In vivo* evaluation of the bacterial contamination and disinfection of acrylic baseplates of removable orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007 Jun; 131(6):705.e11-7.

63. Leung NM, Chen R, Rudney JD. Oral bacteria in plaque and invading buccal cells young orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006; 130: 698.e18.
64. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:547-58.
65. Lim BS, Lee S, Lee J, Ahn SJ. Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008; 133: 882-8.
66. Lindquist B, Emilson CG. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. *Caries Res* 2004;38:95-103.
67. Lindquist B, Emilson CG. Dental location of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in humans harboring both species. *Caries Res* 1991;25:146-152.
68. Lo BA, Di Marco R, Milazzo I, Nicolosi D, Calì G, Rossetti B, Blandino G. Microbiological and clinical periodontal effects of fixed orthodontic appliances in pediatric patients. *New Microbiol.* 2008 Apr;31(2):299-302.
69. Loe H, Schiott CR, Glavind L, Kaning T. Two years oh use of chlorhexidine in man. General design and effects. *J Periodont Res.* 1976; 11:135-4.
70. Loesche WJ, Eklund S, Earnest R, Burt B. Longitudinal investigation of bacteriology of human fissure decay: epidemiological studies in molars shortly after eruption. *Infect Immun* 1984;46(3):765-772.
71. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50:353-80.

72. Lucas VS, Omar J, Vieira A, Roberts GJ. The relationship between odontogenic bacteraemia and orthodontic treatment procedures. *Eur J Orthod.* 2002;24:293-301.
73. Lundstrom F, Krasse B. *Streptococcus mutans* and lactobacilli frequency in orthodontic patients: the effect of chlorhexidine treatments. *Eur J Orthod* 1987;9(2):109-16.
74. McNeill K, Hamilton IR. Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 2003;221:25-30.
75. Magno AFF, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MAN, Faria G, Nelson-Filho P. *In vivo* evaluation of contamination of Super Slick elastomeric rings by *Streptococcus mutans* in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthoped* 2008; 133(4 suppl):S104-9.
76. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health* 2006; 6 (Suplemento 1): S14.
77. Marques da Silva R, Caugant DA, Lingaas PS, Geiran O, Tronstad L, Olsen I. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* but not bacteria of the red complex in aortic aneurysms by multiplex polymerase chain reaction. *J Periodontol.* 2005;76:590-4.
78. Martins-Ortiz MF, Reis-Costa A, Consolaro A. Acúmulo de bactérias e outros produtos sobre o acrílico de aparelhos dentomucossuportados. *Dental Press Ortodon Ortop Facial* 2003; 8:25-26.
79. Martins-Ortiz MF, Freitas PZ, Nelson-Filho P, Consolaro A. Por que se preocupar com a higienização dos aparelhos? *Dental Press Ortodon Ortop Facial* 2004;9: 30-32.

80. Maruo IT, Rosa EAR, Maruo H, Tanaka O, Guariza F, Ignácio AS, Camargo ES. Effects of chlorhexidine mouth rinse on *Streptococci* counts of tooth-tissue-borne palatal expander biofilm. *Orthop Craniofac Res* 2008; 11: 136-142.
81. Matarazzo F, Figueiredo LC, Cruz SE, Faveri M, Feres M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2008 Oct;35(10):885-96.
82. Mattingly JA, Sauer GJ, Yancey JM, Arnold RR. Enhancement of *Streptococcus mutans* colonization by direct bonded orthodontic appliances. *J Dent Res*. 1983; 62:1209-11.
83. Máximo MB, de Mendonça AC, Renata Santos V, Figueiredo LC, Feres M, Duarte PM. Short-term clinical and microbiological evaluations of peri-implant diseases before and after mechanical anti-infective therapies. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Jan;20(1):99-108.
84. Meurman JH, Rytömaa I, Murtomaa H, Turtola L. Erupting third molars and salivary lactobacilli and *Streptococcus mutans* counts. *Scand J Dent Res*. 1987 Feb;95(1):32-6.
85. Moraes SR, Siqueira Júnior JF, Colombo AP, Rôças IN, Ferreira MCS, Domingues RMCP. Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and Checkerboard DNA-DNA Hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. *J. Endod* 2002; 28: 86-9.
86. Morgan TD, Wilson M. Anti-adhesive and antibacterial properties of proprietary denture cleanser. *Journal of Applied Microbiology*. 2000; 89: 617-23.
87. Moshrefi A. Chlorhexidine. *J West Soc Periodontol Periodontal Abstr* 2002; 50:5-9.

88. Naranjo AA, Triviño ML, Jaramillo A, Betancourth M, Botero JE. Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *Am J Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2006; 130:275.e17-275.e22.
89. Nascimento C, Barbosa RE, Issa JP, Watanabe E, Ito IY, de Albuquerque Junior RF. Use of Checkerboard DNA-DNA Hybridization to evaluate the internal contamination of dental implants and comparison of bacterial leakage with cast or pre-machined abutments. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Jun;20(6):571-7.
90. Nyvad B. Microbial colonization of human tooth surfaces. *APMIS Suppl.* 1993;32:1-45.
91. Olympio KP, Bardal PA, de M Bastos JR, Buzalaf MA. Effectiveness of a chlorhexidine dentifrice in orthodontic patients: a randomized-controlled trial. *J Clin Periodontol.* 2006; 33(6): 421-6.
92. Papaioannou W, Gizani S, Haffajee AD, Quirynen M, Mamai-Homata E, Papagiannoulis L. The microbiota on different oral surfaces in healthy children. *Oral Microbiol Immunol.* 2009 Jun;24(3):183-9.
93. Papaioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. *Angle Orthodontist* 2007; 77: 1090-1095.
94. Pavarina AC, Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE. Effects of chemical disinfectants on the transverse strength of denture base acrylics. *Journal of Oral Rehabilitation* 2003; 30: 11085-9.
95. Parson JC. Chemoterapy of dental plaque – a review. *J Periodontol* 1974; 45: 177-86.

96. Peixoto, ITA, Enoki C, Matsumoto MAN, Nelson-Filho. Evaluation oh home disinfection protocols for acrylic baseplates of removable orthodontic appliances: A Randomized Clinical Investigation. Submetido para publicação no JADA. 2009.
97. Rolla G, Melsen B. The mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. J Dent Res 1975; 54:57-62.
98. Rolla G, Loe H, Schiott CR. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity. Arch oral Biol. 1971; 16: 1109-16.
99. Rosa EA, Rached RN, Tanaka O, Fronza F, Fronza F, Araújo Assad R. Preliminary investigation of bacteremia incidence after removal of the Haas palatal expander. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2005 Jan;127(1):64-6.
100. Rosen S, Lenney WS, O'Malley JE. Dental caries in gnotobiotic rats inoculated with *Lactobacillus casei*. J Dent Res. 1968 May-Jun;47(3):358-63.
101. Rosenbloom RG, Tinanoff N. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during, and after orthodontic treatment. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1991; 100:35-7.
102. Rupf S, Merte K, Eschrich K, Kneist S. *Streptococcus sobrinus* in children and its influence on caries activity. Eur Arch Paediatr Dent 2006;7:17-22.
103. Ruvieri DB, Ito IY, Leonardo MR, Silva LAB, Nelson-Filho P. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by Checkerboard DNA-DNA Hybridization. J Dent Child, 2007;74(2):118-23.
104. Sallum EJ, Nouer DF, Klein MI, Gonçalves RB, Machion L, Sallum AW, Sallum EA. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2004;126:363-6.

105. Saito K, Hayakawa T, Kawabata R, Meguro D, Kasai K. In vitro antibacterial and cytotoxicity assessments of an orthodontic bonding agent containing benzalkonium chloride. *Angle Orthod.* 2009;79(2):331-7.
106. Sakamaki ST, Banh AN. Effect of orthodontic banding on localized oral lactobacilli. *J Dent Res.* 1968 Mar-Apr;47(2):275-9.
107. Sari E, Birinci I. Microbiological evaluation of 0.2% clorhexidine gluconate mouth rinse in orthodontics patients. *Angle Orthod* 2007; 77(5): 881-4.
108. Seki M, Yamashita Y, Shibata Y, Torigoe H, Tsuda H, Maeno M. Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries development. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:47-52.
109. Siqueira JF Jr, Rôças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res.* 2009;88(1):61-5.
110. Siqueira Júnior JF, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA Hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 89: 744-8.
111. Smiech-Slomkowska G, Jablonska-Zrobek J The effect of oral health education on dental plaque development and the level of caries-related *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. *Eur J Orthod.* 2007 Apr;29(2):157-60.
112. Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol.* 1989 Mar;4(1):47-51
113. Socransky SS, Manganiello SD. The oral microbiota of man from birth to senility. *J Periodontol.* 1971 Aug;42(8):485-96.

114. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005; 38: 135–87.
115. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134-44.
116. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffage JA, Uzel NG, Goodson JM. Use of Checkerboard DNA-DNA Hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:352-62.
117. Socransky SS, Smith CL, Martin L, Paster BJ, Dewhirsts FE, Levin A E. "Checkerboard" DNA-DNA Hybridization. *Biotechniques* 1994;17: 788-790.
118. Sreenivasan PK, Gaffar A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol*. 2002; 29:965-74.
119. Sreenivasan PK, Mattai J, Nabi N, Xu T, Gaffar A. A simple approach to examine early microbial formation biofilm and effects of treatments. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19: 297-302.
120. Steinberg D, Eyal S. Initial biofilms formation of *Streptococcus sobrinus* on various orthodontics appliances. *Journal of Oral Rehabilitation* 2004; 31:1041-5.
121. Straetemans MM, van Loveren C, de Soet JJ, de Graaff J, ten Cate JM. Colonization with mutans streptococci and lactobacilli and the caries experience of children after the age of five. *J Dent Res*. 1998 Oct; 77(10):1851-5.
122. Sudjalim TR, Woods MG, Manton DJ, Reynolds EC. Prevention of demineralization around orthodontic brackets *in vitro*. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007; 131(6):705.e1-9.
123. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ*. 2001 Oct;65(10):1028-37.

124. Teles RP, Patel M, Socransky SS, Haffajee AD. Disease progression in periodontally healthy and maintenance subjects. *J Periodontol*. 2008 May;79(5):784-94.
125. Tenuta LMA. Delineamento Cross-Over. Disciplina: Estatística experimental. Disponível em: <<http://www.lce.esalq.usp.br/tadeu/TrabalhoCrossoverInternet.pdf-2003>>.
126. Thornberg MJ, Riolo CS, Bayirli B, Riolo ML, Van Tubergen EA, Kulbersh R. Periodontal pathogen levels in adolescents before, during, and after fixed orthodontic appliance therapy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2009 Jan;135(1):95-8.
127. Thylstrup A, Fejerskov O. *Cariologia Clínica*. 2nd ed. São Paulo: Editora Santos; 2001.
128. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using Checkerboard Hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Aug;23(4):282-90.
129. Youravong N, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Geater AF, Dahlen G. Microbiology in toothbrush samples from children exposed to lead in southern Thailand. *Acta Odontol Scand*. 2007 Feb; 65(1):22-8.
130. Zachrisson BU, Zachrisson S. Gingival condition associated with partial orthodontic treatment. *Acta Odontol Scand*. 1972 Mar;30(1):127-36.

APÊNDICES



APÊNDICE A

Comparação da primeira e segunda semanas, no grupo controle, para verificação do efeito *carryover*

Microrganismo	Controle 1ª semana M (Q1-Q3)	Controle 2ª semana M (Q1-Q3)	p*
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10000 (10000-100000)	10000 (10000-100000)	0.9317
<i>Lactobacillus casei</i>	10000 (0-100000)	10000 (10000-100000)	0.8346
<i>Streptococcus mutans</i>	500000 (10000-1000000)	500000 100000-1000000	0.9368
<i>Streptococcus sobrinus</i>	500000 (10000-500000)	500000 (100000-1000000)	0.3907
<i>Actinomyces viscosus</i>	500000 (500000-1000000)	500000 (500000-500000)	0.5114
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	55000 (10000-500000)	100000 (100000-100000)	0.9369
<i>Actinomyces israelii</i>	10000 (10000-100000)	100000 (10000-100000)	0.5775
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	100000 (10000-100000)	55000 (10000-100000)	0.9372
<i>Actinomyces odontolyticus I</i>	500000 10000-500000	100000 (100000-500000)	0.5806
<i>Veillonella parvula</i>	1000000 500000-10000000	1000000 500000-10000000	0.8450
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans a + b</i>	300000 (10000-500000)	100000 (100000-500000)	0.9066
<i>Leptotrichia buccalis</i>	100000 (10000-500000)	100000 (10000-500000)	0.7573
<i>Propionibacterium acnes I + II</i>	10000 (0-10000)	10000 (0-100000)	0.5209
<i>Streptococcus anginosus</i>	500000 (10000-1000000)	500000 (100000-500000)	0.8130
<i>Streptococcus constellatus</i>	300000 (100000-500000)	300000 (10000-500000)	0.7482
<i>Streptococcus gordonii</i>	1000000 (500000-1000000)	1000000 (1000000-1000000)	0.4406
<i>Streptococcus intermedius</i>	300000 (100000-500000)	300000 (10000-500000)	0.9370
<i>Streptococcus mitis</i>	1000000 (500000-1000000)	500000 (500000-1000000)	0.9368
<i>Streptococcus oralis</i>	500000 100000-1000000	500000 (500000-1000000)	0.9366

Microrganismo	Controle 1º semana M (Q1-Q3)	Controle 2º semana M (Q1-Q3)	p*
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1000000 (500000-1000000)	1000000 (500000-1000000)	0.6596
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	500000 (10000 -500000)	750000 (5000-1000000)	0.4363
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	55000 (10000-100000)	100000 (10000-500000)	0.6991
<i>Eikenella corrodens</i>	300000 (100000-1000000)	500000 (500000-1000000)	0.2499
<i>Campylobacter gracilis</i>	50000 (0-100000)	10000 (10000-500000)	0.4363
<i>Campylobacter rectus</i>	10000 (10000-10000)	55000 (10000-500000)	0.4240
<i>Campylobacter showae</i>	55000 (0-100000)	255000 (10000-500000)	0.5103
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	55000 10000-500000	300000 10000-500000	0.3150
<i>Fusobacterium nucleatum ss nucleatum</i>	300000 (0-1000000)	300000 (100000-1000000)	0.6141
<i>Fusobacterium nucleatum ss vincentii</i>	300000 (10000-1000000)	300000 (100000-1000000)	0.6674
<i>Fusobacterium nucleatum ss polymorphum</i>	55000 (10000-500000)	300000 (10000-500000)	0,6141
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	750000 (10000-10000000)	1000000 (100000-1000000)	0.6987
<i>Prevotella intermedia</i>	10000 (0-100000)	55000 (10000-100000)	0.4357
<i>Prevotella melaninogenica</i>	300000 (0-500000)	1000000 (500000-1000000)	0.1304
<i>Prevotella nigrescens</i>	100000 (0-500000)	300000 (10000-500000)	0.3929
<i>Selenomonas noxia</i>	100000 (0-500000)	300000 (10000-500000)	0.7552
Eubacterium nodatum	10000 (0-10000)	10000 (0-100000)	0.9042
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	55000 (10000-500000)	300000 (100000-500000)	0.4574
<i>Tannerella forsythia</i>	10000 (0-100000)	55000 (0-500000)	0.4579
<i>Treponema denticola</i>	5000 (0-10000)	10000 (0-500000)	0.5481
<i>Treponema socranskii</i>	100000 (10000-1000000)	100000 (100000-500000)	0.7870

Valores referentes ao número total de microrganismos encontram-se expressos como M(Q1-Q3), onde M= mediana, Q1= primeiro quartil e Q3= terceiro quartil.

APÊNDICE B

Comparação da primeira e segunda semanas, no grupo tratamento, para verificação do efeito *carryover*

Microrganismo	Tratamento 1º semana M (Q1-Q3)	Tratamento 2º semana M (Q1-Q3)	<i>p</i> *
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10000 (0-10000)	5000 (0-10000)	0.4037
<i>Lactobacillus casei</i>	10000 (10000-10000)	10000 (0-10000)	0.4898
<i>Streptococcus mutans</i>	10000 (10000-100000)	10000 (0-100000)	0.7186
<i>Streptococcus sobrinus</i>)	100000 (0-500000)	100000 (10000-100000)	0.6925
<i>Actinomyces viscosus</i>	100000 (0-500000)	100000 (0-500000)	0.6076
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	10000 0-100000	10000 0-10000	0.3810
<i>Actinomyces israelii</i>	10000 (0-100000)	10000 (0-10000)	0.5209
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	10000 (0-500000)	5000 (0-10000)	0.3718
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	100000 (0-100000)	10000 (0-100000)	0.6059
<i>Veillonella parvula</i>	500000 (0-1000000)	300000 (100000-1000000)	0.8461
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans a + b</i>	10000 (0-500000)	5000 (0-100000)	0.4012
<i>Leptotrichia buccalis</i>	100000 (10000-500000)	10000 (0-100000)	0.1474
<i>Propionibacterium acnes I + II</i>	0 (0-10000)	0 (0-10000)	0.6477
<i>Streptococcus anginosus</i>	55000 (10000-100000)	10000 (0-100000)	0.5056
<i>Streptococcus constellatus</i>	10000 (0-100000)	5000 (0-10000)	0.2326
<i>Streptococcus gordonii</i>	500000 (100000-1000000)	500000 (100000-500000)	0.6937
<i>Streptococcus intermedius</i>	100000 (0-10000)	10000 (0-100000)	0.6394
<i>Streptococcus mitis</i>	500000 (100000-500000)	100000 (100000-500000)	0.7186

Microrganismo	Tratamento 1º semana M (Q1-Q3)	Tratamento 2º semana M (Q1-Q3)	p*
<i>Streptococcus oralis</i>	500000 (10000-500000)	100000 (10000-100000)	0.2006
<i>Streptococcus sanguinis</i>	500000 (100000-1000000)	500000 (100000-500000)	0.6645
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	100000 (0-500000)	10000 (10000-100000)	0.4148
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	10000 (0-100000)	10000 (0-10000)	0.4711
<i>Eikenella corrodens</i>	300000 (100000-500000)	100000 (10000-500000) 0	0.3254
<i>Campylobacter gracilis</i>	5000 (0-100000)	0 (0-10000)	0.4148
<i>Campylobacter rectus</i>	10000 (0-10000)	0 (0-10000)	0.3845
<i>Campylobacter showae</i>	10000 (0-10000)	0 (0-10000)	0.4357
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	55000 (0-500000)	10000 (0-100000)	0.5026
<i>Fusobacterium nucleatum ss nucleatum</i>	100000 (10000-500000)	100000 (0-100000)	0.6059
<i>Fusobacterium nucleatum ss vincentii</i>	10000 (0-500000)	10000 (0-100000)	0.8136
<i>Fusobacterium nucleatum ss polymorphum</i>	10000 (0-100000)	10000 (0-10000)	0,6059
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	500000 (0-1000000)	100000 (0-500000)	0.3733
<i>Prevotella intermedia</i>	5000 (0-10000)	0 (0-10000)	0.3216
<i>Prevotella melaninogenica</i>	100000 (0-100000)	100000 (0-100000)	10000
<i>Prevotella nigrescens</i>	10000 (0-100000)	5000 (0-100000)	0.5447
<i>Selenomonas noxia</i>	10000 (0-100000)	5000 (0-10000)	0.4933
Eubacterium nodatum	5000 (0-10000)	0 (0-0)	0.0571
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10000 (0-500000)	0 (0-100000)	0,2724
<i>Tannerella forsythia</i>	0 (0-100000)	5000 (0-10000)	0.9333
<i>Treponema denticola</i>	5000 (0-10000)	0 (0-10000)	0.3736
<i>Treponema socranskii</i>	55000 (0-100000)	55000 (0-100000)	0.9053

Valores referentes ao número total de microrganismos encontram-se expressos como M(Q1-Q3), onde M= mediana, Q1= primeiro quartil e Q3= terceiro quartil.

ANEXO



ANEXO**Ofício do comitê de ética em pesquisa envolvendo Seres Humanos**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/028/FORP

Senhor Professor,

Ref.: Processo nº 2008.1.163.58.8
CAAE nº 0013.0.138.000-08

A pedido da Profa. Dra. Simone Cecílio Hallak Regalo, Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, Informamos que o referido Comitê, em sua 86ª Sessão, realizada no dia 13 de março de 2008, deliberou **aprovar** o Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos, intitulado: **"Avaliação da contaminação microbiana de aparelhos ortodônticos, com e sem utilização de agente antimicrobiano, pela técnica Checkerboard DNA-DNA Hybridization e quantificação de Endotoxina (LPS) por meio do teste Limulus Amebo cyte Lysate"**, a ser desenvolvido por Vossa Senhoria, na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, devendo o atestado para publicação final ser expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa, após a entrega e aprovação do Relatório Final pelo referido Comitê.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria do Comitê, com o formulário preenchido pelo pesquisador responsável, o **Relatório Parcial** no dia **30 de março de 2009** e o **Relatório Final** no dia **30 de março de 2010**.

Atenciosamente,

Glauce Della Rosa
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. PAULO NELSON FILHO
Professor Titular do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social – FORP/USP
GDR/gdr

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

Marcela Perdiza

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social

Avenida do Café, s/n - CEP 14040-904
Ribeirão Preto – SP
2009

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)